



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
INSTITUTO DO CÉREBRO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS**

**INVESTIGAÇÃO DOS SINTOMAS INICIAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER
EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À INFUSÃO INTRACEREBRAL DE
PEPTÍDEOS AMILÓIDES E DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO
EXTRATO DE *ERYTHRINA VELUTINA* POR MEIO DO LABIRINTO DE
BARNES.**

Priscila Tavares Macêdo.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Regina Helena da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Romualdo Costa.

Natal/RN

2018

PRISCILA TAVARES MACÊDO

**INVESTIGAÇÃO DOS SINTOMAS INICIAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER
EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À INFUSÃO INTRACEREBRAL DE
PEPTÍDEOS AMILÓIDES E DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO
EXTRATO DE *ERYTHRINA VELUTINA* POR MEIO DO LABIRINTO DE
BARNES.**

Tese apresentada à pós-graduação em Neurociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
para obtenção do título de doutor em Neurociências

Natal

2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Árvore do Conhecimento - Instituto do Cérebro - ICE

Macêdo, Priscila Tavares.

Investigação dos sintomas iniciais da doença de alzheimer em ratos wistar submetidos à infusão intracerebral de peptídeos amilóides e do potencial neuroprotetor do extrato de erythrina velutina por meio do labirinto de barnes / Priscila Tavares Macedo. - Natal, 2018.

164f.: il.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Instituto do Cérebro. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientador: Regina Helena da Silva.

Coorientador: Marcos Romualdo Costa.

1. Alzheimer. 2. Peptídeos beta-amilóides. 3. Memória espacial. 4. Preferência de estratégia. 5. Labirinto de Barnes. 6. Erythrina velutina (mulungu). I. Silva, Regina Helena da. II. Costa, Marcos Romualdo. III. Título.

RN/UF/Biblioteca Setorial Árvore do Conhecimento, Instituto do

PRISCILA TAVARES MACÊDO

**INVESTIGAÇÃO DOS SINTOMAS INICIAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER
EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À INFUSÃO INTRACEREBRAL DE
PEPTÍDEOS AMILÓIDES E DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO
EXTRATO DE *ERYTHRINA VELUTINA* POR MEIO DO LABIRINTO DE
BARNES.**

Apresentada em janeiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Vanessa Costhek Abílio.
UNIFESP

Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa.
UFPB

Prof.^a Dr.^a Maria Bernadete Cordeiro de Sousa.
UFRN

Prof. Dr. Rodrigo Neves Romcy Pereira.
UFRN

Prof.^a Dr.^a. Regina Helena da Silva.
UNIFESP
Presidente

Natal-RN
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela força concedida na execução desse trabalho.

Agradeço imensamente a meus pais, Eliede e Elda, a minha tia e segunda mãe, Mazinha, aos meus irmãos, Renata, Mateus e Julia pela torcida e compreensão pelas ausências, além do suporte emocional. Ao meu sobrinho, Rafael, que não tem dimensão do quanto me fez melhor. As minhas tias-avós, Carminha e Dadá, e a minha avó, em memória, pelos cuidados desde a infância.

Agradeço a minha grande amiga Kelly pela força e presença constante, ainda que muitas vezes à distância, nossa amizade só se fortalece, com admiração mútua.

Agradeço enormemente aos meus colegas de trabalho na execução deste, especialmente, a Antônio Carlos, Ywlliane Meurer, Luiz Eduardo, Ramon Hypólito, Clarissa Loureiro, Mateus Oliveira, Sarah Sophia e Marília Felipe.

Agradeço ao mestre Fábio Menezes por me inserir na arte milenar da yoga, um dos melhores capítulos da minha história e evolução pessoal.

Agradeço aos professores Rodrigo Pereira e Claudio Queiroz pelas sugestões na melhoria do trabalho e pelos desafios impostos que contribuíram para o meu amadurecimento profissional.

Por fim, aos professores Marcos Costa e Regina Helena pelas orientações ao longo dessa jornada e, especialmente na reta final, pelo suporte tão necessário, o meu mais sincero muito obrigada.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) afeta cerca de 46,8 milhões de pessoas no mundo, e é caracterizada pelo declínio progressivo da função cognitiva, em especial da memória episódica. É multifatorial, e o acúmulo de peptídeos β -amiloides ($A\beta$) é considerado o principal mecanismo da neurodegeneração subjacente à doença. Os $A\beta$ são os principais componentes das placas amilóides, um dos marcos fisiopatológicos no encéfalo dos pacientes. A infusão intracerebral de $A\beta$ em ratos é um modelo animal de DA muito utilizado, produzindo seu acúmulo em regiões cerebrais afetadas, como o hipocampo e o neocórtex e, produzindo déficits cognitivos compatíveis com os sintomas, como déficits na memória espacial. Porém, a maioria dos estudos evidencia déficits equivalentes aos estágios moderado e avançado da DA após a infusão prolongada de $A\beta$, sem avaliar déficits sutis de estágios iniciais. Isso seria relevante para compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e para o teste de possíveis tratamentos neuroprotetores. Uma tarefa utilizada para avaliar déficits relacionados à disfunção hipocampal em ratos é o labirinto de Barnes. Os animais são expostos a uma plataforma circular, com buracos ao redor, sendo apenas um deles conectado a um esconderijo. Nessa tarefa, os animais guiam-se por pistas distais para encontrar o local seguro. O desempenho é avaliado por parâmetros, como latência e distância até o alvo, número de visitas a buracos errados, dentre outros, e por uma análise específica de estratégias de busca usadas para atingir o alvo. O animal pode se localizar pelas pistas distais (dispostas ao redor do labirinto), utilizando informação espacial (estratégia direta) ou outros tipos de busca, visitando de maneira aleatória ou seriada buracos do aparato (estratégias não diretas). Essa avaliação permite a detecção de alterações no modo de solução da tarefa. No presente trabalho, objetivamos investigar sinais cognitivos iniciais da DA em ratos Wistar submetidos à infusão intracerebral de $A\beta$, e os efeitos de um potencial tratamento neuroprotetor, por meio da avaliação da memória espacial no labirinto de Barnes. Utilizamos o extrato alcalóide de *Erythrina velutina* (“mulungu”), cujos componentes mostram ações ansiolíticas, anti-inflamatórias, antioxidantes e pró-colinérgicas. Na 1ª etapa, padronizamos a tarefa de Barnes para as nossas condições experimentais, e verificamos se há influência da repetição de exposições ao labirinto (importante para verificação de progressão de sinais cognitivos) ou da implantação das cânulas intracerebrais no desempenho dos animais. Animais que passaram ou não pela cirurgia para implantação de cânulas (bilateralmente na sub-região hipocampal CA1 e no ventrículo lateral) passaram por 5 sequências de exposição ao labirinto de Barnes (4 treinos com 4 *trials* cada, um teste após 24h e um teste após 10 dias). Os resultados mostraram que houve aprendizado e evocação da tarefa. Concluímos que a tarefa pode ser realizada repetidamente, e em animais com implantes cerebrais de cânulas, sem prejuízo de desempenho. Na segunda etapa, investigamos o uso de diferentes estratégias no labirinto de Barnes na presença ou ausência de pistas distais. Ratos foram expostos aos treinos no labirinto de Barnes, e no teste (24h após) parte dos animais foi exposta ao labirinto na presença de pistas distais (condição ‘espacial’) e a outra parte passou pelo teste com uma cortina preta em volta do labirinto (condição ‘não-espacial’). Ambos os grupos aprenderam e evocaram a tarefa, entretanto os animais expostos às pistas distais preferiram o uso de estratégia direta, enquanto o grupo não-espacial preferiu outras estratégias. Concluímos que a retirada de pistas distais não impede que os animais encontrem o alvo, e para isso utilizam estratégias de busca alternativas ao uso de informação espacial. Na terceira etapa (2 experimentos) verificamos os efeitos da infusão intracerebral de peptídeos $A\beta$ sobre o aprendizado e a memória no labirinto de Barnes. No experimento 1, ratos receberam 15 infusões diárias

de salina ou A β (30, 100 ou 300 pmol) i.c.v., sendo que no 1º dia de tratamento houve infusões em CA1. Foram submetidos a 3 sequências de exposição ao Barnes (treinos, teste 24h e reteste 10 dias). A sequência I foi realizada antes da cirurgia (na qual ocorreu o aprendizado para todos os animais), a II a partir da 11ª infusão, e a III 10 dias depois. Nas sequências II e III, houve grande variação do comportamento dos animais A β , de modo que não foram observadas diferenças entre os grupos, além de uma alta mortalidade dos animais. Ao fim dos experimentos comportamentais, os animais foram eutanasiados e submetidos à imunohistoquímica para A β , cuja análise por densitometria ótica relativa mostrou aumento de sua marcação no hipocampo e neocórtex. No 2º experimento verificamos os efeitos da infusão de A β sobre o desempenho geral e estratégias de busca no labirinto de Barnes, com algumas alterações no protocolo de infusão e execução da tarefa. Os animais (salina ou A β 30 pmol) foram submetidos a uma sequência de exposição ao Barnes com 4 treinos de 2 *trials* cada e um teste realizado 3 dias depois, visando dificultar a tarefa. Não houve diferenças entre os grupos no aprendizado. No teste, embora os animais A β mostrassem alguma evocação, estes utilizaram preferencialmente estratégias aleatória e seriada, enquanto o grupo salina preferiu a estratégia direta. Concluímos que a infusão de A β promoveu alterações sutis na memória espacial compatíveis com a manifestação inicial da DA, indicando relevância para investigações mecanicísticas e terapêuticas em estágios precoces da doença. Na última etapa, animais submetidos ao mesmo tratamento de infusão com A β (30 pmol) foram tratados concomitantemente com 200 mg/kg do extrato de mulungu por via oral. Os grupos (salina, A β , mulungu e A β + mulungu) foram submetidos a 2 sequências de Barnes (a partir da 11ª infusão e dez dias depois). De forma geral, não foram observadas diferenças entre os grupos nos parâmetros referentes ao aprendizado ou à evocação da tarefa. Sendo assim, concluímos que o protocolo utilizado não foi capaz de detectar um efeito benéfico do extrato de mulungu no modelo de DA por infusão de peptídeos A β .

Palavras-chave: Alzheimer, peptídeos beta-amilóides, memória espacial, preferência de estratégia, labirinto de Barnes, *Erythrina velutina* (mulungu).

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is present in 46.8 million people in the world, and is characterized by the progressive decline of cognition, mainly episodic memory. AD is multifactorial, and the accumulation of amyloid peptides (A β) is the main proposed mechanism underlying neurodegeneration. A β are the main components of the amyloid plaques in the brain, that are physiopathological hallmarks of the disease. Intracerebral infusion of A β in rats is usually used as an animal model of DA and generates the accumulation of these peptides in the brain together with spatial memory impairment. However, most studies show moderate to severe deficits after chronic A β infusion, without evaluation of possible subtle initial deficits. The study of the initial stages of AD is relevant for mechanistic and therapeutic investigations. The Barnes maze has been used for investigating deficits in the hippocampal function in rats. The animals are exposed to a circular apparatus with holes in its periphery. One of the holes is connected to a safe place. In this task, rats navigate guided by distal cues to find this safe compartment. The evaluation is conducted by parameters of general performance (latency and distance to reach target, number of errors, among others) and by a specific analysis of search strategies. In this way, the animal uses spatial information and moves directly towards the target (direct strategy), visits sequential holes until reaching the target (serial strategy) or visits holes in a non-systematic fashion until reaching the target (aleatory search). The analysis of strategies allows the detection of alterations in the mode of solution of the task. In the present study, we aimed to investigate initial cognitive signs of AD in Wistar rats submitted to intracerebral infusions of A β , as well as the effects of a potentially neuroprotective treatment, by the evaluation of spatial memory in the Barnes maze. We used the alkaloid extract of *Erythrina velutina* ("mulungu"), which was previously studied for anxiolytic, anti-inflammatory, antioxidant and cholinergic actions. First, we standardized the task to our experimental conditions, and verified a possible influence of repeated exposures to the apparatus (for future long-term protocols) or of the implantation of the cannulas in the brain. Rats went through (or not) to implantation of cannulas (bilaterally in the hippocampal CA1 and in the lateral ventricle) and were exposed to 5 sequences of exposition to the Barnes maze (4 training sessions with 4 trials each, a 24h test and a 10-day retest sessions). Both groups showed task retrieval, and there was a slightly improved performance in the implanted group. We concluded that the task can be held repeatedly, and in implanted animals, without altering the performance. In the second phase, we investigated the use of different strategies in the Barnes maze by rats submitted to the presence or absence of distal cues. Rats were exposed to the training phase, and in the probe session (24 h later) half the animals were exposed to the maze in the presence of the same distal cues used in training (spatial group), while the other rats went through the probe test without those cues (a black curtain was placed around the maze – non-spatial group). Both groups learned the task, but the spatial group preferred the use of direct strategies, while the non-spatial group preferred other strategies. We concluded that the removal of distal cues does not hinder the execution of the task, and the animals use alternative search modes under this condition. In the third phase (two experiments) we verified the effects of the intracerebral infusion of A β on the acquisition and retrieval of Barnes task. In experiment 1, rats received 15

daily i.c.v. infusions of saline or A β (30, 100 or 300 pmol) plus bilateral CA1 infusions in the first day, and were exposed to 3 sequences of Barnes task (training, 24h test and 10-day retest in each sequence). Sequence I was held before surgery (all the animals learned the task), II started at 11th infusion and III started 10 days after II. The behavior of the A β -treated animals varied greatly at sequences II and III, and hence no differences were observed. There was high mortality due to treatment. At the end of the behavioral sessions, saline and A β 30pmol groups were euthanized for A β immunohistochemistry. The analysis by relative optical density showed increased A β staining in the hippocampus and neocortex. In experiment 2 we investigated the effects of A β (30 pmol) infusion on the search strategies in the Barnes maze. Animals went through one sequence of Barnes task (4 trainings with 2 *trials* each and a 3-day test, in order to increase difficulty). In the probe test, although A β animals showed some retrieval, they showed preference for non-spatial strategies, opposed to saline-treated rats. We concluded that A β infusion induced subtle alterations in spatial memory, compatible with the initial stages of AD, which is relevant for investigations of potential neuroprotective approaches. In the last stage, animals submitted to the same infusion protocol described above were concomitantly treated orally with 200 mg/kg of *E. velutina* (mulungu) extract and went through 2 Barnes task sequences. In general, no differences were observed among the groups in acquisition or retrieval. Thus, we concluded that the protocol used here was not able to detect a beneficial effect of mulungu extract in the A β infusion AD model.

Keywords: Alzheimer's disease, beta amyloid peptides, spatial memory, strategy preference, Barnes maze, *Erythrina velutina* (mulungu), cholinesterase.

SUMÁRIO

1.	Introdução	12
1.1	Doença de Alzheimer	12
1.2	Memória espacial no labirinto de Barnes	18
1.3	<i>Erythrina velutina</i>	21
2.	Objetivos	26
2.1	Geral	26
2.2	Específicos	26
3.	Materiais e métodos gerais	28
3.1	Sujeitos experimentais	28
3.2	Procedimentos experimentais	28
3.2.1	Cirurgia estereotáxica	28
3.2.2	Fármacos	29
3.2.3	Labirinto de Barnes	29
3.2.4	Análise imunohistoquímica	32
3.2.5	Análise estatística	33
4.	Capítulo I: Padronização do labirinto de Barnes, efeitos da repetição de sequências de exposição, e possível interferência da implantação de cânulas	35
4.1	Introdução	35
4.2	Objetivos	37
4.3	Materiais e métodos	37
4.4	Resultados	39
4.4.1	Barnes I	39
4.4.2	Barnes II	44
4.4.3	Barnes III	49
4.4.4	Barnes IV	52
4.4.5	Barnes V	54
4.4.6	Análise entre sequências no labirinto de Barnes	56
4.5	Discussão	58
5.	Capítulo II: Avaliação de estratégias para solução do labirinto de Barnes por animais expostos ou não a pistas distais	61
5.1	Introdução	61
5.2	Objetivo	63
5.3	Materiais e Métodos	63
5.4	Resultados	64
5.5	Discussão	68
6.	Capítulo III: Efeitos da infusão intracerebral de peptídeos amiloides no desempenho de ratos no labirinto de Barnes	71
6.1	Introdução	71
6.2	Objetivo	73
6.3	Experimento I	74
6.3.1	Materiais e métodos	74
6.3.2	Resultados	75
6.3.2.1	Barnes I	76
6.3.2.2	Barnes II	79
6.3.2.3	Barnes III	82
6.4	Experimento II	85

6.4.1 Materiais e métodos	85
6.4.2 Resultados	86
6.4.3 Discussão	91
7. Capítulo IV: Efeitos do extrato hidroalcolico de <i>Erythrina velutina</i> sobre o desempenho de animais infundidos com peptídeos A β no labirinto de Barnes	97
7.1 Introdução	97
7.2 Objetivo	99
7.3 Materiais e métodos	100
7.4 Resultados	101
7.4.1 Barnes I	101
7.4.2 Barnes II	103
7.5 Discussão	105
8. Conclusões	108
Referências	109
ANEXO I	142
ANEXO II	143

1. Introdução

1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer compreende aproximadamente 70% dos casos de demência (Fratiglioni, et al. 1999, Small, et al. 1997). A prevalência cresce exponencialmente com a idade, atingindo aproximadamente 3% em torno dos 70 anos até quase 50% acima dos 85 anos (Zhu & Sano, 2006). A etiologia do Alzheimer é multifatorial. Complexas relações entre vários fatores, tais como: histórico familiar, traumas (Graves, et al. 1990, McKee, et al. 2009), genética (APP, presenilinas 1 e 2, APOE 4), sexo feminino, baixo nível educacional (Katzman, 1993, Beard, et al. 1992, Bonaiuto, et al. 1995, Butler, et al. 1996), hiperlipidemia, hipertensão, homocisteínemia, diabetes melitos, obesidade (Barnes & Yaffe, 2011, Rosendorff, et al. 2007, Sharp & Gatz, 2011, Van Den Heuvel, et al. 2007) conduzem à doença. Entretanto, o principal fator contribuinte é o avanço da idade (Farlow, 2007). O Alzheimer afeta cerca de 46,8 milhões de pessoas em todo o mundo (World Alzheimer Report, 2015).

O Alzheimer é a principal doença neurodegenerativa ligada ao envelhecimento, e é caracterizada pelo declínio progressivo da memória episódica recente e da função executiva (LaFerla & Oddo, 2007, Tarawneh & Holtzman, 2012). A variabilidade sintomatológica depende de fatores contribuintes, como idade de início, histórico familiar e aparecimento de sintomas não-cognitivos, entre eles alterações motoras e comportamentais, por consequência, conduz à elevada variabilidade na progressão e sobrevivência (Tarawneh & Holtzman, 2012). A maioria dos casos de Alzheimer é esporádico, idade-dependente e de início tardio (Hebert et al., 2003).

Desde a primeira descrição da demência senil por Alois Alzheimer em 1907, placas senis e emaranhados neurofibrilares são considerados os marcadores patológicos da doença (Alzheimer et al. 1987, Maurer et al., 1997, Newell, et al. 1999). A identificação de peptídeos beta-amilóides ou A β (Glenner & Wong, 1984), além dos estudos de mutações em APP (Goate, et al. 1991, Levy-Lahad, et al. 1995, Sherrington, et al. 1995) e nos genes presenilinas 1 e 2 (Levy-Lahad, et al. 1995, Sherrington, et al. 1995), estão presentes na maioria dos casos precoces familiares (Goate, et al. 1991, Levy-Lahad, et al. 1995, Giasson, et al. 2003), o que levou à formulação da hipótese da cascata

amilóide para explicar a causa do Alzheimer. Ela propõe que a geração, deposição e acúmulo de A β é anterior à formação de placas e emaranhados (Selkoe, 1991, Hardy & Allsop, 1991, Hardy & Higgins, 1992).

O principal componente das placas beta-amilóides é o polipeptídeo A β (Masters, et al. 1985, Glenner & Wong, 1984), proveniente da proteína precursora amilóide (APP). Várias funções têm sido descritas ao ectodomínio de APP, incluindo propriedades neuroprotetoras (Anliker & Muller 2006, Zheng & Koo 2006). Suas mutações ocorrem próximas aos sítios de processamento de secretases contribuindo para um ganho de função por mecanismo de toxicidade, conduzindo assim, ao aumento dos níveis de fragmentos A β neurotóxicos (Serrano-Pozo, et al. 2011). A atividade da β -secretase é o passo limitante da via amiloidogênica, e processa cerca de 10% da APP celular. Os outros 90% são clivados pela α -secretase (metaloproteases), compreendendo a via não-amiloidogênica, formando produtos solúveis e neuroprotetores (sAPP α) e reduzindo a produção de A β (VanMarum, 2008). A γ -secretase também cliva o produto da clivagem da α -secretase, gerando elementos citosólicos com papel na transdução de sinais (Cao & Sudhof, 2001, Gao & Pimplikar, 2001, Kimberly, et al. 2001, Hardy & Selkoe, 2002).

Os peptídeos A β 1-40 são mais abundantes, compreendendo de 80 a 90% da quantidade de peptídeos, os quais têm baixa propensão a agregação (Zou et al., 2002). Por outro lado, A β 1-42 mesmo produzida em baixas concentrações, entre 5 e 10%, tem maior tendência a formação de oligômeros, protofibrilas e fibrilas, sendo considerado determinante na formação das placas (Walsh & Selkoe, 2007, Selkoe, 2001, Hamaguchi, et al. 2009, Philipson, et al. 2009, Tomiyama, et al. 2010, LaFerla & Duff, 2011). A presença dessas formas de A β prejudicam a plasticidade sináptica e a memória (McDonald et al., 1994, Walsh et al., 2002, Cleary et al., 2005, Townsend et al., 2006, Shankar et al., 2007, 2008, Balducci et al., 2010) sugerindo serem mediadoras da disfunção neuronal em estágios precoces da doença (Selkoe, 2002). Todos esses achados falam em favor da hipótese da cascata amilóide (Hardy & Allsop, 1991).

Tem-se iniciada uma nova fase na pesquisa da doença, no sentido de identificar mudanças sutis cognitivas e biológicas que antecedam o seu curso clínico, permitindo que intervenções terapêuticas sejam introduzidas antes que o declínio não possa ser interrompido (Langbaum et al., 2013, Reiman & Langbaum, 2009, Reiman et al., 2010, 2011, Bateman et al., 2011, Aisen et al. 2011). Nesse intuito, as alterações

neuropatológicas decorrentes de disfunções neuronais podem ser identificadas cerca de uma a duas décadas antes dos sintomas clínicos pronunciados (Price & Morris 1999, Jack Jr. et al., 2010, 2013, Fleisher et al., 2012).

A cascata patológica da doença se inicia devido à deposição de peptídeos A β em agregados oligômeros ou fibrilares (McLean et al., 1999, McDonald et al., 2010, Fukumoto et al., 2010, Lesné et al., 2013). Permanece para ser solucionado se a neurodegeneração depende dos estados conformacionais dessas e outras proteínas, uma vez que várias evidências sugerem que os agregados menores e oligômeros solúveis são mais patogênicos que os agregados fibrilares, ordenados e insolúveis (Morris et al., 2011, Winner et al., 2011). Oligômeros A β solúveis são tóxicos aos neurônios e causam déficits na potenciação de longo prazo (Walsh, et al. 2002, Kaye, et al. 2003), provando que conduzem o progresso da doença mais que os depósitos. Análises bioquímicas e sequenciais revelam que a toxicidade dos fragmentos amilóides se inicia, aparentemente, com a formação fibrilar (Glenner & Wong 1984, Masters, et al. 1985).

Os eventos moleculares desencadeantes da cascata patológica incluem anormalidades neuríticas e sinápticas (Scheff, et al. 1990, 2006, 2007, DeKosky & Scheff, 1990, Terry, et al. 1991, Masliah, et al. 1993, Scheff & Price, 1993, Gomez-Isla, et al. 1996, Gomez-Isla, et al. 1997, Knowles, et al. 1999) decorrentes da toxicidade de A β (Walsh & Selkoe, 2007), causando alterações, tais como, disfunção na potenciação de longo prazo (Walsh, et al. 2002, Kaye, et al. 2003 e no transporte axonal (Suzuki & Terry, 1967, Praprotnik, 1996, Smith & Perry, 1997), estresse oxidativo (Perry, et al. 2002, Castellani, et al. 2004, Nunomura, et al. 2006), interrupção da homeostase intracelular do cálcio (Praprotnik, et al. 1996, Bosman, et al. 1991, Nitsch, et al. 1992, Roth, et al. 1995) e disfunções mitocondriais (Decker et al., 2010, Du et al., 2008, Querfurth & LaFerla, 2010, Sheng & Cai, 2012).

Nesse sentido, em indivíduos com Alzheimer, prejuízos em interneurônios inibitórios e oxidação de glutamina sintetase, produzem um excesso de glutamato, que por sua vez, causa ativação excessiva de receptores NMDA, tendo como consequência toxicidade e degeneração neuronal, parecendo ter, também, um papel destacado na cascata patogênica (Meilandt, et al. 2008, Palop & Mucke, 2009, Palop & Mucke, 2010, Sanchez-Mejia, et al. 2008, Verret, et al. 2012). Esses mecanismos potenciais provocam mudanças na distribuição ou atividade de neurotransmissores e moléculas de sinalização

relacionadas (Jo, et al. 2011, Li, et al. 2011, Palop & Mucke, 2010, Renner, et al. 2010, Röncke, et al. 2011).

Tais manifestações neuropatológicas se dão, principalmente, nas regiões hipocampal e entorrinal (Dickerson et al., 2001, Johnson et al., 2012), acometendo a memória episódica (Resnick et al., 2010, Storandt et al., 2009, Ellis et al., 2013, Lim et al., 2013). A perda de sinapses e complexidade dendrítica é melhor correlacionada ao declínio cognitivo que a morte neuronal per se (Tanzi, 2005, Palop et al., 2007), apresentando-se em estágio precoce da doença (Marchetti & Marie, 2011, Palop & Mucke, 2010).

O prejuízo inicial na memória episódica característico da doença é explicado pelo acometimento do lobo temporal medial pela degeneração neurofibrilar. O próximo acometimento atinge as áreas de associação no isocórtex gerando disfunção executiva (córtex pré-frontal), apraxias (córtex parietal), déficits visuoespaciais (córtex occipito-temporal) e de memória semântica (córtex temporal anterior), caracterizando o quadro demencial. Em contraste, o envolvimento tardio de áreas motoras, sensoriais e isocorticais visuais pode explicar o relativo déficit nessas áreas, muitas vezes não visualizado por grande parte do curso da doença (Hyman, et al. 1984, Arnold, et al. 1991, Braak & Braak, 1991). Além disso, o hipocampo, o subículo e CA1 mostram maior quantidade de achados característicos da doença (placas amilóides, emaranhados neurofibrilares e degeneração granulovascular) que outras regiões da formação hipocampal (Hirano & Zimmerman, 1962, Ball, 1978, Wilcock & Esiri, 1982). A vulnerabilidade seletiva pode ser mediada pela citoarquitetura e circuitos locais (Hyman, et al. 1984, Hyman, et al. 1986). Ainda é ponto de investigação, no entanto, se os emaranhados neurofibrilares e as placas β -amilóides são marcadores patológicos de dano ou constituem uma resposta neuroprotetora aos danos decorrentes da demência (Serrano-Pozo, et al. 2011).

As características visualizadas na condição humana patológica são evidenciadas em modelos animais (Huang & Mucke, 2012), mesmo sem formação de placas (Hsia et al. 1999), interferindo nos processos de aprendizado, memória e outras funções cognitivas. Attar e colaboradores (2013) demonstraram que o modelo triplo transgênico de Alzheimer (Oddo, et al. 2003) apresenta déficits no desempenho de um protocolo curto (5 sessões por treino, durante 4 dias) no labirinto de Barnes, havendo tanto o aumento do número de erros, quanto a latência para atingir o esconderijo, quando comparados a camundongos selvagens. Outros trabalhos também têm utilizado o labirinto de Barnes

como tarefa espacial em modelos de Alzheimer (O'Leary & Brown, 2009, Rodriguez, et al. 2013, Larson, et al. 2012, Walker, et al. 2011, Ambree, et al. 2009).

Simultaneamente, várias pesquisas usam grupamentos sintéticos pré-fibrilares de A β provando sua atividade sinaptotóxica (Lambert, et al. 1998, Klein, et al. 2001, Klein, 2002, Walsh, et al. 2002, Walsh & Selkoe, 2004, Glabe, 2005, Lesne, et al. 2006, Townsend, et al. 2006, Lacor, et al. 2007, Klyubin, et al. 2008, Shankar, et al. 2008, McDonald, et al. 2010, Pham, et al. 2010). Lambert e colaboradores (1998) averiguaram pela primeira vez que formas fibrilares solúveis peptídicas eram neurotóxicas, havendo morte neuronal causada pelo bloqueio de LTP em culturas (Lambert, et al. 1998, Wang, et al. 2004). Apoiando esses achados, a injeção intracerebroventricular de oligômeros derivados de culturas celulares que expressam APP humana mutada, em ratos saudáveis causou inibição da LTP hipocampal (Walsh, et al. 2002) e prejuízo à memória (Cleary, et al. 2005). A administração de fatores restauradores como neurotrofinas ou antioxidantes poderia reverter ou retardar a injúria ocasionada sobre neurônios e suas sinapses (Selkoe, 2011).

Na tentativa de mimetizar a progressão lenta da doença, estudos usaram a infusão contínua intracerebral de A β causando neurodegeneração e prejuízo em aprendizado e memória (Flood, et al. 1991, Pepeu, et al. 1996, Nabeshima & Itoh, 1997a, 1997b, Yamada, et al. 1999a). Nitta, et al. (1994) mostraram que a infusão contínua e diária de 300 pmol de A β 1-40 prejudicou a memória de referência espacial, na tarefa de labirinto aquático de Morris, além de déficit na esquivas passiva, acompanhados por sutil, mas significativa redução da atividade acetilcolina-transferase no hipocampo. O acúmulo de A β 1-40 foi visto por meio de imunohistoquímica no hipocampo e córtex após 14 dias de infusão (Nabeshima & Nitta, 1994, Nitta, et al. 1994). Outros estudos verificaram os efeitos da infusão intracerebroventricular contínua de A β 1-42, em ratos, no labirinto aquático de Morris e revelaram prejuízo significativo na memória espacial e de trabalho (Nitta, et al. 1994, 1997, Yamada, et al. 1999b, 1999c). Foi também demonstrada pela diálise *in vivo* que a liberação de acetilcolina, no córtex e hipocampo, é significativamente reduzida pela infusão contínua de A β 1-40 em ratos (Itoh, et al. 1996).

Nakamura e colaboradores (2001) realizaram infusão intracerebroventricular de A β 1-42 em ratos, durante três dias e, posteriormente, avaliaram prejuízos cognitivos e neuroquímicos (redução de acetilcolina-transferase no hipocampo e estriado) após 20 e

80 dias. Como resultados, foi verificado déficit nas tarefas de alternância espontânea (memória operacional), labirinto aquático de Morris (memória espacial) e esquiva passiva (memória de longo prazo não-espacial), de forma dose e tempo-dependentes, sugerindo o efeito progressivo da disfunção.

Takeda e colaboradores (2009) validaram o uso de A β 1-40 como modelo para sintomatologia e fisiopatologia do Alzheimer. O modelo aborda a validade de face, de constructo e preditiva em camundongos. A validade de face corresponde à similaridade fenomenológica do modelo, cujos comportamentos devem ser correlacionados aos sintomas da demência, averiguada em experimentos que envolveram a administração de A β 1-40, intracerebroventricular, em camundongos, submetidos ao labirinto aquático de Morris. Os animais que tiveram a administração realizada antes do treino exibiram prejuízo na aquisição após seis dias de administração, mas quando injetados antes do teste, não apresentaram déficit na recordação. Esses dados aproximam o modelo dos déficits na memória episódica anterógrada no Alzheimer inicial (Granholm & Butters, 1988, Martin, et al. 1985, Weingartner, et al. 1983). A validade de constructo refere-se às semelhanças entre os mecanismos causadores do modelo e da demência. Nesse estudo, há aproximação da hipótese da cascata amilóide com consequente disfunção colinérgica (Hardy & Higgins, 1992) e atrofia inicial dos lobos temporais mediais (Fox, et al. 1996, Jack Jr., et al. 1999), sendo a disfunção hipocampal ocasionada por A β . A validade preditiva se refere à habilidade do modelo permitir previsões corretas sobre o fenômeno humano, por exemplo, a identificação preditiva de agentes terapêuticos. O anticolinesterásico galantamina, correntemente usado no tratamento do Alzheimer melhorando seus sintomas (Raskind, et al. 2000, Tariot, et al. 2000, Wilcock, et al. 2000), foi testado nos animais infundidos com A β 1-40 havendo preservação da memória na tarefa do labirinto aquático. No entanto, não foram observadas placas, depósitos de tau ou perda neuronal no modelo, o que pode sugerir ser necessário um maior período de tempo após administração de A β , exposição contínua ou mesmo a presença de A β 1-42 para verificação desses achados, conforme outros estudos (Van Dam & De Deyn, 2006, Yamada & Nabeshima, 2000). O modelo de infusão da A β tem provado sua aproximação aos sintomas do Alzheimer e apoia estudos posteriores para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Takeda, et al. 2009).

Não obstante os modelos animais serem incapazes de reproduzir todas as características (comportamentais, cognitivas, bioquímicas e histopatológicas), os achados neles obtidos se aproximam da doença em humanos (Tarawneh & Holtzman 2009, Huang & Mucke, 2012). Sendo assim, mostram-se adequados a elucidar mecanismos, genéticos e farmacológicos (Yamada & Nabeshima, 2000), sobretudo em estudos de estágios precoces. Dessa forma, modelos animais que mimetizem achados de déficits cognitivos compatíveis com a sintomatologia do Alzheimer, especialmente no que se refere aos sinais iniciais, são imprescindíveis para investigações de novos agentes neuroprotetores ou terapêuticos. Para esse fim, as tarefas cognitivas utilizadas para avaliar os déficits em modelos animais devem propiciar a detecção de alterações sutis em aspectos relevantes para a doença, como por exemplo a memória espacial.

1.2 Memória espacial no labirinto de Barnes

A memória espacial pode ser tida como um tipo de memória episódica (Olton, 1979) que é responsável pelo reconhecimento, codificação, estocagem e recordação de informações quanto a disposição de objetos em um meio ou quanto ao estabelecimento de rotas (Kessels et al., 2001). A estocagem de longo-prazo de informações espaciais é tida como memória de referência espacial (Olton, 1979). O arcabouço cognitivo responsável pela memória espacial é altamente vulnerável ao declínio decorrente da idade (Park et al., 1982, 1983, Evans et al., 1984, West et al., 2002) e a doenças neurodegenerativas (Possin, 2010). O hipocampo é a estrutura responsável pela formação de memórias declarativas e episódicas (Scoville & Milner, 1957, Clayton & Dickinson, 1998, Squire et al., 2004, Eichenbaum et al., 2007), que podem ser estudadas por meio de tarefas espaciais (Moser et al., 1993, Moser et al., 1995, Morris et al., 1982, Barnes, 1979, Zhang et al. 2002).

No hipocampo, existem as chamadas células de lugar, dispostas em sub-regiões específicas, apresentando características diferenciais correspondentes. Em conjunto, essas células formam mapas cognitivos do meio onde o animal se move (O'Keefe & Nadal, 1978). O papel do hipocampo no aprendizado e memória espacial foi bem estabelecido por estudos de lesões e eletrofisiológicos (Brandeis et al. 1989, Buzsaki & Moser 2013, Whitlock et al. 2006). O córtex entorrinal também apresenta papel no

mapeamento espacial (Leutgeb et al. 2005), estabelecendo comunicação com o hipocampo (Hafting et al. 2005, Leutgeb et al. 2005).

A navegação aloccêntrica refere-se à habilidade de usar pistas distais dispostas no ambiente para guiar-se espacialmente, ficando a cargo do hipocampo e córtex entorrinal (Shrager et al. 2008, Buzsaki & Moser 2013). Enquanto a navegação do tipo egocêntrica utiliza parâmetros internos para localização no espaço, criando uma rota de execução, ou seja, o caminho é decorrente da aplicação de regras e hábitos aprendidos, cuja rede neural responsável é estriatal e a memória é classificada como procedural (van Strien et al., 2009). Doenças neurodegenerativas impactam a cognição espacial, refletindo na execução de navegação aloccêntrica e egocêntrica (Possin, 2010). Sutis declínios na navegação espacial podem ser verificados no curso inicial do Alzheimer, como já visualizado em modelo animal transgênico com dano hipocampal, o qual mostrou prejuízo no uso de pistas distais na tarefa de Morris (Deipolyi et al., 2008), bem como em testes de realizada virtual com humanos, o que sugere que a vulnerabilidade da navegação aloccêntrica (Bohbot et al., 2007; Cushman et al., 2008; Ishii et al., 2005).

O labirinto de Barnes foi originalmente desenvolvido por Carol Barnes para ratos senescentes (Barnes, 1979), servindo ao estudo de memórias de referência espacial e memória de procedimentos, dependendo do delineamento executado (Sunyer et al. 2007). O labirinto de Barnes apropria-se das características etológicas de roedores da evitação dos ambientes abertos e luminosos, motivando-o à procura de ambientes fechados e seguros, além de não necessitar de manipulações prévias como restrição alimentar ou ainda a exposição a estímulos muito aversivos como choque ou imersão em água para realizar uma tarefa (Barnes, 1979, Holscher, 1999, Miyakawa et al., 2001).

Os roedores são expostos a uma plataforma circular, acima do nível do chão, com buracos ao redor, no qual apenas um deles apresenta um local seguro. No intuito de aumentar a motivação dos animais para exploração, são dados leves estímulos de reforço negativo como luz, som ou jatos de ar. A plataforma original desenvolvida por Barnes tinha como dimensões o diâmetro de 1,22m, 18 buracos na periferia com 9,5cm de diâmetro cada. O perímetro circular era elevado do chão distando 91cm. A caixa elaborada como esconderijo apresentava 18cm de diâmetro (Barnes, 1977). O labirinto de Barnes constitui uma tarefa de referência espacial, no qual os animais são guiados por pistas distais para encontrar o local seguro por livre exploração (Sunyer et al. 2007). O protocolo típico do Barnes segue as fases de habituação, aquisição e teste. A memória é

avaliada por uma série de parâmetros incluindo porcentagem de tempo no quadrante alvo, número de erros, latência e distância até o alvo, além de análises de perfis de busca usados para atingir o alvo, definidos por estratégias espacial/ direta, seriada ou aleatória (Sunyer et al. 2007, Harrison et al. 2006, O'Leary & Brown, 2009, 2012, O'Leary, 2011, Bach et al. 1995, Barnes, 1979).

O labirinto de Barnes pode ser utilizado para estudar o prejuízo na memória espacial em modelos de Alzheimer (Attar et al. 2013, O'Leary & Brown, 2009, Pompl et al. 1999). Animais transgênicos portadores de genes mutantes para APP e PS1 são potenciais modelos de Alzheimer, apresentando características da doença em início precoce, inclusive apresentando elevados níveis dos principais peptídeos produzidos, A β 1-40 e A β 1-42 (Minkeviciene et al. 2008, Jankowsky, 2004). Estudos no labirinto de Barnes com o modelo triplo transgênico de Alzheimer (O'Leary & Brown, 2009) evidenciaram diferenças do controle antes da idade de 6 meses, que a literatura aponta como necessária para identificação do prejuízo cognitivo. Os animais transgênicos aos 4 meses de idade, já tiveram seus prejuízos cognitivos determinados na tarefa de Barnes, utilizando um protocolo curto de sessões de treino (5 *trials*) em comparação a protocolo extenso (15 *trials*), o qual não foi capaz de evidenciar diferenças entre os grupos. Esse estudo indica que o correto delineamento experimental, reduzindo o reforço no aprendizado pode revelar diferenças sutis precocemente (Pompl et al. 1999, Attar et al. 2013). A repetida exposição ao aprendizado pode mascarar déficits, gerando uma associação geral a forma de executar a tarefa em aprendizado subsequentes, constituindo um aprendizado da regra geral (Reiserer et al., 2007).

Em conjunto, esses dados da literatura apontam o uso do labirinto de Barnes como tarefa espacial para avaliar o declínio cognitivo em modelos animais de Alzheimer, servindo para investigar as alterações comportamentais e moleculares de intervenções indutoras ou terapêuticas.

1.3 *Erythrina velutina*

Erythrina velutina é uma árvore de grande porte (6-10m), popularmente chamada “mulungu”. Sua ocorrência se dá ao longo da costa norte e nordeste do Brasil. Devido a suas propriedades sedativas e calmantes, é usada tradicionalmente na medicina popular para estados de agitação, ansiedade, insônia, convulsões e tosse nervosa (Dantas, et al. 2004, Santos, et al. 2012a). O extrato de caule na forma de pó (12g/dia), infusão ou decocção (1-2 xícaras por dia) ou extrato fluido (1-4ml/dia) compõem a posologia principal da medicina popular (Teske & Trentini, 1995, Matos, 1997), entretanto essa extração põe em risco a sobrevivência da espécie (Dantas, et al. 2004, Santos, et al. 2012a). Por isso, vários trabalhos têm sido feitos usando o extrato das folhas, que também exibem tais efeitos (Dantas, et al. 2004, Marchioro, et al. 2005), além de não mostrarem toxicidade aguda nas doses acima de 5g/kg (Craveiro et al., 2008). Pesquisas mostraram em sua composição a presença de alcalóides e flavonóides (McKee, et al. 1997, Garcia-Mateos, et al. 1981, Kôbaiashi, et al. 1997, Telikepalli, et al. 1990, Hegde, et al. 1997). Em contraposição, verifica-se escassez de estudos farmacológicos sobre seus efeitos (Dantas, et al. 2004). Estudos fitoquímicos revelaram a presença de lecitinas (Oliveira, et al. 1998), alcalóides (Folkers & Shavel, 1951) e flavonóides (Da Cunha, et al. 1996) no extrato hidroalcoólico do caule de *Erythrina velutina*. Já o extrato aquoso das folhas de *E. velutina*, quando analisado em cromatografia de camada fina, exhibe como constituintes, além dos flavonóides e alcalóides já citados, fenóis, taninas, antocianinas, xantonas, esteróides, triterpenos, saponinas e cumarinas (Matos, 1997).

Camundongos tratados com extrato bruto de folhas de *E. velutina*, em baixas doses, 10 e 50mg/kg, intraperitonealmente, não reduziram a atividade motora em campo aberto quando comparados aos controles. Já na dose de 200mg/kg, houve redução do número de cruzamentos e *grooming*. Após três dias de habituação ao campo aberto, também reduziu o número de *rearings*, e esta foi considerada uma medida de retenção à prévia exposição. No modelo do sono induzido por fenobarbital (Carlini, et al. 1986), os animais mostraram potenciação na sedação de forma dose-dependente (10, 100, 300mg/kg). Ratos Wistar tratados com 10mg/kg exibiram bloqueio da aquisição da esQUIVA passiva *step-through*, quando comparados aos controles. Assim, doses superiores a 50mg/kg foram capazes de diminuir a atividade locomotora, enquanto doses baixas (10mg/kg) bloqueiam a habituação e a retenção na esQUIVA inibitória. Tais resultados

levaram à conclusão de que baixas doses interferem em processos mnemônicos, ao mesmo tempo em que elevadas doses, causam efeitos sedativos ou bloqueadores neuromusculares (Dantas, et al. 2004). Foi demonstrado que extratos alcalóides de espécies de *Erythrina* possuem propriedades bloqueadoras neuromusculares (Lehman, 1937, Megirian, et al. 1995), o que pode explicar resultados de decréscimo na atividade locomotora. Vianna, et al. (2001) relatou que a memória para a habituação e esquia inibitória são processadas no hipocampo e córtex entorrinal, podendo ser alvos do extrato no sistema nervoso central. Nesse sentido, estudos com fatias cerebrais hipocampais e extrato alcoólico de folhas de *E. velutina* interromperam potenciais pós-sinápticos excitatórios (Sarasqueta, et al. 2002).

Flausino, et al. (2007) verificou a redução ansiedade em camundongos submetidos a alcalóides isolados de *Erythrina mulungu*, após administração aguda. O extrato administrado agudamente aumentou a latência de esquia no labirinto e na caixa claro-escuro, de forma similar ao diazepam (Onusic, et al. 2002, 2003). Outros experimentos envolvendo a administração aguda (100, 200 e 400mg/kg, o.p.) e crônica (21 dias, 50, 100, e 200 mg/kg, o.p.) do mesmo extrato mostraram efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado, mas não houve diferença entre os grupos tratados e o grupo controle na locomoção em campo aberto, indicando que os efeitos ansiolíticos não estão relacionados à sedação. Ao mesmo tempo, não foram vistas diferenças quanto à imobilidade em animais tratados, fosse administração aguda ou crônica, no teste de nado forçado, excluindo uma ação antidepressiva dos extratos, sem haver ainda, hipolocomoção.

No estudo de Raupp e coautores (2008), camundongos foram tratados, oralmente, com doses agudas ou crônicas (23-26 dias) do extrato hidroalcoólico do caule de *E. velutina*. Os animais que receberam 100mg/kg, cronicamente, aumentaram o número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado, indicando efeito ansiolítico. O teste do nado forçado não identificou efeito antidepressivo do extrato, em qualquer dose ou forma de tratamento. Em contrapartida, houve prejuízo da habituação, tida como uma memória não-associativa, nas doses de 10mg/kg (aguda) e 50mg/kg (crônica). Tais achados apoiam os efeitos ansiolíticos da *E. velutina*, já evidenciados em outros estudos com espécies do gênero (Ribeiro, et al. 2006, Onusic, et al. 2002, Onusic, et al. 2003, Flausino, et al. 2007) e, em baixas doses, amnésicos (Dantas et al. 2004, Raupp, et al. 2008).

A inibição de acetil e butirilcolinesterases foi avaliada em cérebros de camundongos, *in vitro* e *ex vivo*, com a administração de extratos aquoso e alcalóide de *E. velutina*. Para a atividade *in vitro*, os cérebros foram submetidos a concentrações de 0 a 1,6mg/ml dos extratos, resultando na inibição de ambas as colinesterases, diretamente dependente da dose. Os camundongos tratados com doses de 100, 200 ou 400mg/kg, oralmente, para avaliação *ex vivo*, mostraram que somente a dose mais elevada do extrato aquoso (400mg/kg) foi capaz de inibir a atividade das colinesterases, por outro lado, todas as doses do extrato alcalóide causaram a inibição, também mostrando atividade dose-dependente. As diferenças entre os resultados usando extrato aquoso ou alcalóide apoiam ser a fração alcalóide a responsável pela inibição colinesterásica (Santos, et al. 2012a).

Tanto a acetilcolinesterase, quanto a butirilcolinesterase hidrolisam acetilcolina em vertebrados, diferindo em suas cinéticas, bem como expressão e atividade em diferentes áreas cerebrais. A butirilcolinesterase tem sua produção elevada ao longo do tempo, enquanto a atividade de acetilcolinesterase se reduz com o avanço do Alzheimer. Por isso, agentes terapêuticos que ajam sobre ambas as enzimas podem ter eficácia superior àqueles que possuem atividade colinesterase seletiva (Lane, et al. 2006). Verificando as proporções epidemiológicas do Alzheimer, vemos que não há agentes terapêuticos eficazes em impedir a progressão da doença, portanto, novas drogas com maior eficiência e segurança são necessárias (Ballard, et al. 2011). Vários fitoterápicos têm sido pesquisados por suas propriedades colinesterásicas, entre eles: *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae), *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) e *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae), promovendo alívio dos sintomas demenciais (Akhondzadeh, et al. 2003a,b, Mukherjee, et al. 2007, Weinmann, et al. 2010).

A regulação de acetilcolina se mostra como fator importante para doenças degenerativas, a exemplo, o Alzheimer, cuja manifestação clínica se dá por distúrbios de memória e outras funções cognitivas. Portanto, a inibição da colinesterase é o principal alvo terapêutico hoje em dia, permitindo a elevação extracelular de acetilcolina (Ballard, et al. 2011). Os potentes agentes terapêuticos usados atualmente, rivastigmina e galantamina, são anticolinesterásicos com constituição alcalóide (Ballard, et al. 2011). Outros fitoalcalóides estão sendo testados para o tratamento do Alzheimer, por exemplo, o alcalóide quinolizidina, huperzine-A, isolado de *Huperzia serrata* e *Huperzia dalhousieana*, Huperziaceae (Wang, et al. 2006, Ahmed, et al. 2013). Além disso, o indol alcalóide natural, a fisostigmina, foi usado para o desenvolvimento do inibidor

colinesterásico sintético de mesmo nome (Pulok, et al. 2007). Diante disso, tendo as folhas de *E. velutina* elevado conteúdo de alcalóides, podem ser considerados agentes potenciais para o desenvolvimento de anticolinesterásicos (Santos, et al. 2012a).

Um experimento *ex vivo* foi conduzido para avaliar a ação do extrato sobre o sistema nervoso central, após administração oral, o que evidenciou sua passagem pela barreira hematoencefálica. Dessa maneira, o uso potencial dos extratos como inibidores centrais de ambas acetilcolinesterases foi proposto (Santos, et al. 2012a). Além disso, estudos prévios mostrando efeitos sedativos e ansiolíticos de extratos das folhas de *E. velutina* (Dantas, et al. 2004, Marchioro, et al. 2005) reforçam ainda mais seu uso como terapêutica para o Alzheimer, já que a agitação e a ansiedade estão entre as comorbidades presentes (Mega, et al. 1996), melhorando a qualidade de vida geral e, não apenas os sintomas deletérios sobre a memória (Santos, et al. 2012a).

Estudo recente mostrou atividade antiinflamatória e anticoagulante de inibidor da família Kunitz de sementes de *E. velutina*, que não demonstrou citotoxicidade no sangue periférico humano. Em modelos de sepse peritonial, o inibidor isolado e caracterizado bioquimicamente, depletou a migração leucocitária, reduzindo-a em 71% comparado ao grupo controle, inibindo a liberação de TNF- α e estimulando a síntese de IFN- α e interleucina-12 (Machado, et al. 2013). Estudos têm atribuído muitos dos efeitos comportamentais de *Erythrina* à atividade inibidora de proteases (Lima, et al. 2011, Komarnytsky, et al. 2011, Joubert, 1982, Kimura, et al. 1993, Nishiyama, et al. 2006, Kishimura, et al. 2012, Chan & Lumen, 1982, Joubert, et al. 1981, Nakajima, et al. 2011, Kouzuma, et al. 1992). Os inibidores do tipo-Kunitz são bem caracterizados como bloqueadores de serina-peptidases (Fan & Wu, 2005, Santos, et al. 2012b) envolvidas na agregação plaquetária, coagulação, fibrinólise e inflamação (González-gonzález, et al. 2003). O que corrobora mais uma vez sua possível ação sobre o Alzheimer, devido à participação de componentes inflamatórios em sua fisiopatologia (McGeer, et al. 2006, Sastre et al., 2011).

A comparação direta entre os estudos é dificultada pelos diferentes protocolos (tarefas, vias e tempo de administração) e formas dos extratos utilizados, conduzindo a achados ainda não bem determinados, com os efeitos sobre a memória, necessitando de maiores investigações. A ausência de déficit cognitivo com baixas doses ocasionando efeitos ansiolíticos pode indicar a separação entre efeitos ansiolíticos e amnésicos de

acordo com a dose, sugerindo que o aumento da dose eleva algum constituinte que exerce ação antiamnésica (Raupp, et al. 2008). Isso pode ser explicado por estudos que realizem o isolamento dos componentes de *E. velutina* (Santos, et al. 2012a).

Experimentos desenvolvidos para propor o mecanismo de ação do extrato aquoso das folhas da planta, usaram o íleo de cobaia, *in vitro*, e mostraram contratilidade decorrente da aplicação do extrato, cuja intensidade é diretamente proporcional à dose. Experimentos realizados a seguir com antagonistas, mostraram que o mecanismo de contração é causado pela liberação de acetilcolina e tem efeito similar a agonistas muscarínicos, com aumento intracelular de cálcio por canais tipo-L e sua liberação do meio intracelular (Carvalho, et al. 2009).

A maior parte dos fitoquímicos com potencial atividade inibitória sobre as colinesterases (acetil e butirilcolinesterase) tem em sua composição alcalóides, principalmente, seguidos por terpenos, esteróides, flavonóides e glicosídeos. Alguns alcalóides possuem ainda potentes propriedades antioxidantes, reduzindo a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de deslocar a cascata amilóide para via não-amiloidogênica (Jung, et al. 2009). Os alcalóides dos tipos triterpenos, esteroidais, indóis, isoquinolinas e licopenos são os que possuem elevada atividade anticolinesterásica, sendo agentes terapêuticos promissores para quadros de deficiência de acetilcolina, como o Alzheimer, entre eles estão as espécies *Bacopa monniera*, *Ginkgo biloba*, *Acorus calamus*, *Epimedium koreanum*, *Rhododendron ponticum*, *Rhododendron luteum*, *Corydalis solida*, *Glaucium corniculatum*, *Buxus sempervirens* e *Huperzia serrata* (Das, et al. 2002, Orhan, et al. 2004, Perry, et al. 2000, Perry, et al. 2001, Mukherjee, et al. 2007, Orhan, et al. 2005, Ata, et al. 2010, Choudhary, et al. 1987, Andrade, et al. 2005, Kim, 2002, Halldorsdottir, et al. 2010, Ahmed, et al. 2006, Riaz, et al. 2004, Ahmed, et al. 2013). Apoiando esses achados, a *E. velutina* também se mostrando um potencial agente terapêutico, haja vista sua composição e mecanismos de ação sugeridos em trabalhos anteriores (Raupp, et al. 2008, Santos, et al. 2012a, Carvalho, et al. 2009).

Dessa forma, nesse trabalho pretendíamos induzir alterações cognitivas em ratos, por meio da infusão intracerebral de peptídeos beta-amilóides, avaliando disfunções sutis na execução de tarefa espacial do labirinto de Barnes e, aproximando tais disfunções dos déficits verificados em estágios precoces da Doença de Alzheimer. A investigação dos

estágios precoces possibilitaria o estudo de alterações mecanicísticas e intervenções, conduzindo ao melhor entendimento da doença e à efetividade da terapêutica.

2. Objetivos

2.1 Geral

O objetivo geral do presente estudo foi investigar sinais cognitivos iniciais da Doença de Alzheimer em animais Wistar submetidos à infusão intracerebral de peptídeos amilóides, bem como o potencial neuroprotetor de extrato alcalóide de *Erythrina velutina*, por meio da avaliação da memória espacial no labirinto de Barnes.

2.2 Específicos

- I. Padronizar a tarefa do labirinto de Barnes para as nossas condições experimentais, e verificar se há influência da repetição de exposições ao labirinto ou da implantação das cânulas para infusão intracerebral no desempenho dos animais;
- II. Estudar o uso de diferentes estratégias no labirinto de Barnes em animais submetidos a diferentes condições contextuais: exposição ou não a pistas espaciais;
- III. Verificar os efeitos da infusão intracerebral de peptídeos beta-amilóides (A β 1-40 e A β 1-42) sobre o aprendizado e a memória no labirinto de Barnes, considerando o desempenho geral da tarefa e o uso de diferentes estratégias;
- IV. Verificar os efeitos de *Erythrina velutina* no desempenho de ratos submetidos à infusão intracerebral de peptídeos beta-amilóides (A β 1-40 e A β 1-42) no labirinto de Barnes.

Os experimentos realizados para atender a estes objetivos foram organizados em capítulos, e seus respectivos métodos específicos, resultados e discussões foram descritos adiante.

3. Materiais e métodos

3.1 Sujeitos experimentais

Os ratos foram criados no biotério do Laboratório de Estudos de Memória em Roedores da UFRN, e alojados em grupos de cinco animais em gaiolas plásticas com dimensões de 30cm de comprimento x 37cm de largura x 16cm de altura e mantidos em ambiente com isolamento acústico e sob condições controladas de temperatura (25 ± 1 °C), umidade e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 6h). Os animais tiveram livre acesso à água e comida. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e da International Brain Research Organization (IBRO), na publicação Nº 85-23, revisada em 1985 do Instituto Nacional de Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. O nosso protocolo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da UFRN (nº50/2014). Foram utilizados para todos os experimentos 108 ratos machos Wistar de 6 meses de idade. Os animais passaram por sessões diárias de 5 minutos de manipulação por 5 dias antes do início dos procedimentos experimentais, visando reduzir o estresse e permitir a familiarização dos animais com o experimentador. Além disso, os animais foram alocados na sala onde ocorreram as injeções e experimentos com 30 minutos de antecedência para ambientação.

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com quetamina (100mg/kg) e xilazina (50mg/kg) para o implante bilateral de cânulas no hipocampo, acima de CA1 (coordenadas ântero-posterior = -4,2mm do bregma, meso-lateral = $\pm 3,0$ mm, dorso-ventral = -2,1mm) e uma cânula em um dos ventrículos laterais, os quais foram randomizados entre os animais

(ântero-posterior = 0,9mm, meso-lateral = \pm 1,8mm, dorso-ventral = -3,0mm). As coordenadas foram obtidas pelo atlas Paxinos & Watson (2007).

3.2.2 Fármacos

Peptídeos A β foram infundidos intracerebralmente em CA1 e no ventrículo lateral. Foram utilizados os peptídeos A β 1-40 e 1-42, os principais constituintes das placas amilóides, sendo o segundo mais insolúvel e iniciador dos depósitos (Walsh & Selkoe, 2007, Selkoe, 2001, Hamaguchi, et al. 2009, Philipson, et al. 2009, Tomiyama, et al. 2010, LaFerla & Duff, 2011, Schmidt, et al. 2009), obtidos da Sigma. Os peptídeos foram solubilizados em solução salina 0,9% e submetidos a pré-tratamento agregante, mantidos em estufa a 37°C (Pike et al. 1991, Maurice, et al. 1996, Urani, et al. 2004) separadamente por três dias, no quarto dia foram misturados para finalização da agregação. A relação de A β 1-40 e 1-42 na solução seguiu a proporção relatada na literatura de A β 1-40 dez vezes superior a A β 1-42 (Suzuki et al., 1994, Iwatsubo et al., 1994, Gravina et al., 1995), compondo soluções finais de concentrações de 30, 100 e 300pmol.

O extrato hidroalcoólico das folhas de *Erythrina velutina* liofilizado foi obtido do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe. O extrato foi solubilizado em salina 0,9%, aquecido a 37°C para solubilização e filtrado. A administração foi feita oralmente, por gavagem, na dose de 200mg/kg.

Protocolos específicos de tratamento foram detalhados abaixo, na descrição dos delineamentos experimentais.

3.2.3 Labirinto de Barnes

A doença de Alzheimer acomete inicialmente as áreas transentorrinais e o hipocampo (Hirano & Zimmerman, 1962, Ball, 1978, Wilcock & Esiri, 1982), com prejuízo da memória episódica recente (Hyman, et al. 1984). O labirinto de Barnes é um aparato eficaz para avaliar memórias hipocampo-dependentes (Barnes, 1979). É constituído por uma arena circular com 20 buracos, nos quais somente um permite acesso

a um esconderijo. Quando exposto ao aparato e a estímulos aversivos fracos (luzes), a tendência natural do animal é explorar o ambiente e procurar um lugar seguro com pouca iluminação (esconderijo). O labirinto de Barnes aqui utilizado foi feito de madeira, com diâmetro de 1,20m, e colocado em uma plataforma a 90cm de altura. Apresentava 20 buracos de 10cm de diâmetro cada, e o esconderijo era uma caixa de madeira com revestimento escuro de dimensões 10x10x15cm. O procedimento foi realizado em uma sessão de adaptação (máximo de 5 minutos) no primeiro dia, quatro sessões de treino que contaram com duas ou quatro passagens (*trials*, com duração máxima de 5 minutos) de cada animal por dia, durante quatro dias, além de uma sessão de teste (máximo de 90 segundos).

Os animais foram postos a cada sessão no centro do aparato dentro de um compartimento opaco, sem fundo, do qual foram liberados para livre exploração. O compartimento foi elevado a partir de um sistema de roldana preso ao teto, sendo puxado pelo experimentador, evitando a sua interferência no ambiente, a qual serviria como pista espacial.

Nas sessões de habituação e treinos, os animais foram expostos ao aparato na presença do esconderijo, porém a localização na sessão de habituação foi distinta das sessões de treino, pois aquela devia conferir apenas a exposição para a familiarização do animal aos ambientes novos (aparato e esconderijo), evidenciando uma situação não ameaçadora. Em outro sentido, as sessões seguintes deviam constituir um reforço do aprendizado e para isso, em todas, os animais foram expostos ao aparato com a manutenção do esconderijo na mesma configuração espacial em relação a pistas distais. Nessas sessões, caso não achassem o esconderijo até o teto de cinco minutos eram guiados a entrar no alvo gentilmente, permanecendo nele por um minuto. Na sessão de teste, por sua vez, com intervalos de 24h, 3 dias ou 10 dias depois do último treino, o animal foi exposto ao aparato sem a presença do esconderijo, sendo analisados parâmetros que demonstraram a lembrança para o local onde havia o esconderijo.

As sessões experimentais foram registradas em vídeo, e os parâmetros comportamentais calculados por programa de rastreamento de animais (ANY-maze, Stoelting, USA).

Na avaliação do aprendizado e evocação da memória no labirinto de Barnes foram utilizados os seguintes parâmetros:

- Distância total percorrida e velocidade média durante a exploração do aparato (Barnes, 1979);

- latência e distância para acerto: tempo gasto (Barnes, 1979) e distância percorrida até atingir o buraco alvo, aquele que contém o esconderijo (sessões de treino), ou continha o esconderijo (sessão de teste);

- número de acertos: número de visitas ao buraco alvo, tanto na sessão de teste, quanto nas de treinos, pois nessas, o animal podia identificar o alvo mas continuar explorando o aparato, sem entrada no esconderijo;

- número de erros totais (Barnes, 1979): número de visitas ou revisitas a buracos diferentes do buraco alvo;

- número de erros primários (O’Leary & Brown, 2009) e secundários (Barnes, 1979; Barrett et al., 2009): número de visitas realizadas pela primeira vez a um buraco diferente do alvo e número de visitas repetidas a buracos diferentes do alvo, respectivamente.

- latência e distância para erros primários (Sunyer et al., 2007, Attar et al. 2013) e secundários: respectivamente, tempo gasto e distância percorrida até o primeiro erro primário e até o primeiro erro secundário;

- porcentagem de tempo em quadrantes (alvo, oposto, direito e esquerdo; Attar et al. 2013): representado pela fórmula – $(\text{tempo gasto em cada um dos quadrantes} \times 100) / \text{tempo gasto em todos os quadrantes}$;

- pesquisa de estratégias classificadas como direta, seriada ou aleatória (Bach et al., 1995, Harrison et al., 2006): corresponde a análise do traçado do animal na sessão de teste, sendo computado um uso de estratégia cada vez que ele realizou um acerto. A estratégia direta foi contabilizada quando o animal moveu-se diretamente ao alvo ou do buraco adjacente para ao alvo; estratégia seriada foi considerada quando o animal realizou pelo menos três visitas a buracos dispostos sequencialmente, em sentido horário ou anti-horário, imediatamente antes de atingir o alvo; estratégia aleatória foi definida pela visita a pelo menos três buracos de maneira não-sistemática antes de atingir o alvo, ou seja, visitas a buracos aleatórios, não adjacentes, antes de ir ao alvo. As análises de estratégias foram computadas para comparações entre grupos sendo reunidas nos seguintes parâmetros – preferência inicial (primeira estratégia adotada para atingir o alvo) e porcentagem média de preferência de estratégia em cada grupo para sessão total de 90 segundos do teste (porcentagem de escolhas feitas por cada animal e, a seguir realizada a

média dessas porcentagens por estratégia em cada grupo). A preferência inicial (Harrison et al. 2006) foi analisada pela fórmula: número de animais que usou determinada estratégia como escolha inicial x 100 / número de animais do grupo. A porcentagem média de preferência foi dada pela fórmula, para cada animal: número de escolhas por determinada estratégia x 100/ número total de escolhas por animal e, a seguir realizada a média desse cálculo para o grupo.

Protocolos específicos de cada experimento foram detalhados abaixo, na descrição dos delineamentos experimentais.

3.2.4 Análise imunohistoquímica para peptídeos A β

A análise imunohistoquímica foi realizada no capítulo III, experimento I. Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma superdose de tiopental sódico (Cristália, Brasil, 60mg/Kg). Seguindo a anestesia, foram perfundidos intracardiacamente, por meio de bomba de infusão, com solução salina (NaCl 0,9%, tampão fosfato de sódio, pH 7,4), cerca de 300ml, por 15 minutos, seguida de paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato 0,1 M (TF) pH 7,4, também cerca de 300ml, por 15 minutos, para fixação. Os encéfalos foram removidos, imersos em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato (pH 7,4), a 4°C, para crioproteção. Após esse processo, foram congelados rapidamente em meio de inclusão Tissue-Tek® (Sakura, Japão) dentro de moldes plásticos inseridos em uma mistura de álcool etílico e gelo seco. O material foi mantido em freezer a -80°C até as análises. Cortes coronais dos encéfalos com 30 μ m de espessura foram obtidos com o uso de criostato (Leica CM 15105). Os cortes foram coletados sequencialmente em 5 poços, alocando em cada poço o corte correspondente (primeiro corte no primeiro poço, segundo corte, no segundo poço, sucessivamente), repetindo-se sempre a cada poço, o intervalo de 150 μ m, o que permitiu cortes de alturas diferentes.

As secções de um compartimento de cada animal foram lavadas (5 vezes de 5 minutos) com tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, sob agitação automática, e pré-tratadas com peróxido de hidrogênio a 0,3% em PB por 20 minutos para inativação da peroxidase endógena. Os cortes foram colocados em contato com o anticorpo anti-peptídeo A β , produzido em camundongo (Santa Cruz), diluído 1:500 em PB contendo Triton-X

100 (ICN Biomedicals) a 0,4% e de soro normal (Sigma) a 2% do animal em que foi obtido o anticorpo secundário durante 16 horas (25°C). Em seguida, as secções foram colocadas em contato com o anticorpo secundário biotinilado, na concentração de 1:1000 (Jackson), diluído em Triton-X 100 a 0,4%, por 90 minutos. Após esta etapa, os cortes foram incubados numa solução contendo avidina e biotina (2% da solução total) mais Triton-X 100 NaCl, por 90 minutos. Para visualizar a reação, os cortes foram colocados em contato com um cromógeno, a diaminobenzidina (DAB; Sigma, St Louis, MO, USA) a 2,5% diluída em PB (0,1M / pH 7,4). Entre cada uma das etapas foram realizadas cinco lavagens do tecido, de cinco minutos cada, com PB a 0,1 M e pH 7,4. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secas em temperatura ambiente, e posteriormente mergulhadas em uma solução de tetróxido de ósmio a 0,05%, por 30 segundos, para intensificação da reação. A seguir, foi realizada contra-coloração de Nissl para evidenciar os núcleos celulares.

A avaliação dos resultados imunohistoquímicos foi feita com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus, BX-41) utilizando campo claro ou escuro conforme a necessidade. As imagens serão digitalizadas utilizando uma câmera (Nikon, DXM-1200) acoplada ao microscópio e conectada a um computador. Para a avaliação densitométrica, todas as imagens foram obtidas sem mudança na iluminação do microscópio e realizadas por ImageJ. Além disso, não foram realizados ajustes de brilho e contrastes das fotos submetidas à análise de densitometria óptica relativa (DOR).

3.2.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média para dados de distribuição normal, enquanto aqueles de distribuição não-normal foram avaliados por testes não-paramétricos e expressos como mediana. A análise de distribuição da amostra foi feita pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. A significância estatística para cada parâmetro entre grupos ou sessões foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via e *posthoc* de Bonferroni, ou ANOVA de medidas repetidas com correção de Bonferroni para comparações múltiplas. As análises ao longo de sessões de aprendizado foram feitas tanto por *trials*, quanto por treinos (agrupando-se os *trials* de cada treino). Como não verificamos diferenças importantes entre as duas formas de

apresentação dos dados, preferimos a apresentação em *trials* e, para fins de demonstração, inserimos um exemplo na figura 1, onde há a representação por treinos e por *trials* para a distância na primeira observação de Barnes.

Quando a comparação foi feita apenas entre dois grupos foi utilizado o teste T de Student não-pareado. Análises intra-grupo para duas variáveis foram feitas com T de Student pareado. Para análises de dados não-normais, verificados nos parâmetros de número de erros e acertos, as comparações ao longo das sessões foram realizadas por Friedman, seguidas de Wilcoxon para determinar a existência de diferenças entre as sessões, nesse caso, as análises entre grupos foram realizadas por Kruskal-Wallis para comparações de mais de dois grupos e Mann-Whitney para comparações entre dois grupos. Aplicamos a correção de Bonferroni para o nível de significância pelo número de comparações realizadas. Teste Exato de Fisher (X^2) foi utilizado para comparações de preferências de estratégias entre grupos, juntamente com *odds ratio* para verificar o *risco relativo* para a ocorrência do evento, o que nos deu uma magnitude da associação demonstrada pelo Fisher, com intervalo de confiança de 95% (Szumilas, 2010; O.R., 95% I.C.). Todos os testes utilizados foram avaliados ao nível de significância inferior a 5% ($p < 0,05$). As análises foram feitas com o auxílio do programa SPSS 21.0.

4. Capítulo I

Padronização do labirinto de Barnes, efeitos da repetição de sequências de exposição e possível interferência da implantação de cânulas.

4.1 Introdução

O labirinto de Barnes apropria-se das características etológicas de roedores da evitação dos ambientes abertos e luminosos, motivando-o à procura de ambientes fechados e seguros, além de não necessitar de manipulações prévias como restrição alimentar ou ainda a exposição a estímulos muito aversivos como choque ou água para realizar uma tarefa (Barnes, 1979, Holscher, 1999, Miyakawa et al., 2001). Foi desenvolvido por Barnes (1979) como uma plataforma circular para o aprendizado de localização de um esconderijo, para avaliação de aprendizado e memória espacial. A configuração é similar e anterior ao labirinto de Morris (Morris, 1984), além de apresentar vantagens de não induzir à ansiedade pela exposição a um meio não natural e, ainda, evita a exploração na periferia do aparato – tigmotaxia - já que não há paredes (Holscher, 1999). Por outro lado, os leves estímulos motivacionais frequentemente usados, tais como, luz, ruído ou jato de ar, podem conduzir à alta exploração do meio, ou ainda, reduzir a procura pelo local seguro ao longo das exposições na fase de aprendizado (Sunyer et al. 2007). Assim como o labirinto de Morris, o de Barnes constitui-se originalmente em uma tarefa de referência espacial, na qual os animais são guiados por pistas distais para encontrar o local seguro por livre exploração (Sunyer et al. 2007).

Inicialmente desenvolvido para ratos para verificar déficits cognitivos decorrentes da senescência (Barnes, 1979), foi posteriormente adaptado para camundongos (Bach et al., 1995). O labirinto de Barnes é utilizado para estudar memória espacial em modelos de Alzheimer (O’Leary & Brown, 2009, Pompl et al. 1999), idade avançada, traumas, lesões, disfunções neurais, estresse e em animais transgênicos para genes relativos a aprendizado e memória (Zhang et al., 2002, Seeger et al., 2004). Também é utilizado para avaliar o desempenho de diferentes linhagens (O’Leary et al., 2011, Barrett et al. 2009) e condições de exposição ao aprendizado (Harrison et al. 2006).

O protocolo típico do Barnes segue as fases de habituação, aquisição e teste. Na fase de habituação, o animal é posto no aparato para livre exploração do mesmo e do local seguro. Durante a fase de aquisição, roedores são postos para explorar o aparato por uma série de sessões, cujo número varia em diferentes protocolos, mas em conjunto são repetições de exposição para aprendizado do local seguro, o qual permanece fixo ao longo de toda fase de aquisição, constituindo um aprendizado referencial espacial, em que os animais são guiados por pistas distais ao redor do aparato. Na fase de evocação, os animais são expostos às mesmas condições de exploração às quais se submeteram na série de treinos, contudo, o local seguro é retirado, assim é avaliada a memória referencial espacial para o local anteriormente aprendido. O intervalo entre a aplicação do teste e a última sessão de aprendizado varia conforme o objetivo dos protocolos. A memória é avaliada por uma série de parâmetros incluindo porcentagem de tempo no quadrante alvo, número de erros, latência e distância até o alvo, além de análises de perfis de busca usados para atingir o alvo, definidos como estratégias direta, seriada ou aleatória (Barnes, 1979, Sunyer et al. 2007, Bach et al., 1995, O’Leary & Brown, 2009, Pompl et al. 1999).

A memória espacial em ratos foi originalmente verificada com teste de retenção realizado após um intervalo de uma semana após o último treino (Barnes et al., 1980), enquanto em camundongos são realizados intervalos menores de 2 a 3 horas (Holmes et al., 2002) ou após um dia do último treino (Miyakawa et al., 2001, O’Leary & Brown, 2009).

O desenho do aparato e os procedimentos do teste influenciam tarefas espaciais como Morris e labirinto radial de oito braços, por exemplo, o tamanho do aparato, presença de paredes e o acesso a pistas distais (Crusio, 1999, Van Dam & De Deyn, 2006, Wahlsten, 2011), o número de *trials* e o intervalo entre *trials* e para o teste (Brandeis et al., 1989, D’Hooge & De Deyn, 2001, Vorhees & Williams, 2006). Tais influências nas medidas de aprendizado e memória também foram observadas no labirinto de Barnes (Barrett et al. 2009, O’Leary & Brown, 2009). Demandas cognitivas para execução da tarefa de Barnes são influenciadas pelo desenho experimental e pelo procedimento usado no teste, como o uso ou não das pistas espaciais e, portanto, refletindo no tipo de aprendizado e memória expresso pelos animais (O’Leary et al., 2011), o qual pode ser acessado pela avaliação de estratégias de busca do buraco alvo, designadas como direta (com o uso de pistas distais para localização do alvo), seriada ou aleatória, conforme proposto em estudos anteriores (O’Leary et al., 2011,

Sunyer et al., 2007). A estratégia utilizada por animais pode também ser definida pelo uso ou não de pistas distais, sendo classificada em navegação aloccêntrica e egocêntrica, respectivamente (Vorhees & Williams, 2014).

Apesar do labirinto de Barnes ter sido bastante utilizado para verificação de déficits cognitivos em modelos transgênicos de Doença de Alzheimer (como mencionado na introdução desta tese), apenas um estudo prévio investigou os efeitos da infusão cerebral de peptídeos A β nessa tarefa. Esse trabalho anterior mostrou um déficit generalizado do desempenho de camundongos após a infusão prolongada (35 dias) dos peptídeos, o que seria compatível com alterações cognitivas em estágios moderado ou avançado da doença (Morzelle et al., 2016). No presente estudo, conforme será descrito em capítulos posteriores, pretendíamos avaliar déficits que corresponderam aos estágios iniciais, assim como uma possível progressão dos mesmos ao longo do tempo. Para isso, foi necessário verificar se a avaliação comportamental no labirinto de Barnes podia ser repetida, sem comprometer o desempenho dos animais. Ainda, existia a possibilidade da implantação das cânulas para administração intracerebral dos peptídeos influenciar no desempenho da tarefa, o que também foi avaliado nesse primeiro capítulo.

4.2 Objetivos

No presente capítulo tivemos como objetivo padronizar a tarefa do labirinto de Barnes para as nossas condições experimentais, e verificar se havia influência da repetição da sequência de exposições ao labirinto ou da implantação das cânulas para infusão intracerebral no desempenho dos animais.

4.3 Materiais e métodos

Utilizamos 16 ratos Wistar, 6 meses de idade os quais foram submetidos a cinco sequências de exposições ao labirinto de Barnes, sendo que em cada sequência deveria ocorrer o aprendizado de um novo local do esconderijo. Inicialmente, os animais foram submetidos a cinco dias de manipulação, a seguir, iniciamos as séries de exposições ao labirinto de Barnes, com intervalos de 10 dias entre elas. A exposição inicial ao labirinto

de Barnes foi realizada por seis dias, os animais passaram por uma sessão de habituação, por quatro treinos (quatro *trials* por dia) nos quatro dias seguintes, e no 6º dia por uma sessão de teste. A seguir, metade dos animais (N=8) foi submetida à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas guias (uma no ventrículo lateral e outras duas bilateralmente em CA1), enquanto a outra metade (N=8) não foi submetida ao implante, constituindo respectivamente, os grupos implantados e não-implantados. A cirurgia foi realizada no intervalo entre a primeira e a segunda exposições ao aprendizado no labirinto de Barnes. Após recuperação da cirurgia, constituindo o intervalo de 10 dias, os animais passaram pela segunda exposição, que ocorreu ao longo de 5 dias (4 dias de treinos e um de teste). A cada dez dias após o teste, os ratos passaram por nova exposição ao Barnes, constituindo ao total 5 séries de aprendizados (denominadas Barnes I a V). A cada série de treinos, os animais foram expostos ao aprendizado da localização de um esconderijo, que permaneceu no mesmo local em relação às pistas espaciais, dispostas nas paredes laterais em torno do aparato, distando 50cm dele. Antes de cada nova exposição, os animais realizaram o reteste (teste após 10 dias) da exposição anterior, e para a nova exposição, uma nova localização do esconderijo foi dada. Dessa forma, as sequências de exposição ao Barnes foram realizadas nos dias 1 a 6, 16 a 20, 30 a 34, 44 a 48 e por fim, 58 a 62. Nessa última exposição não realizamos o reteste de 10 dias. O aparato foi limpo a cada trial com álcool 5% (Figura 1).

Os parâmetros avaliados a cada trial dos treinos e nos testes 24h e 10 dias foram a distância total percorrida, latência e distância para o acerto, latência e distância para o primeiro erro e para o primeiro erro secundário, e porcentagem de tempo no quadrante alvo.

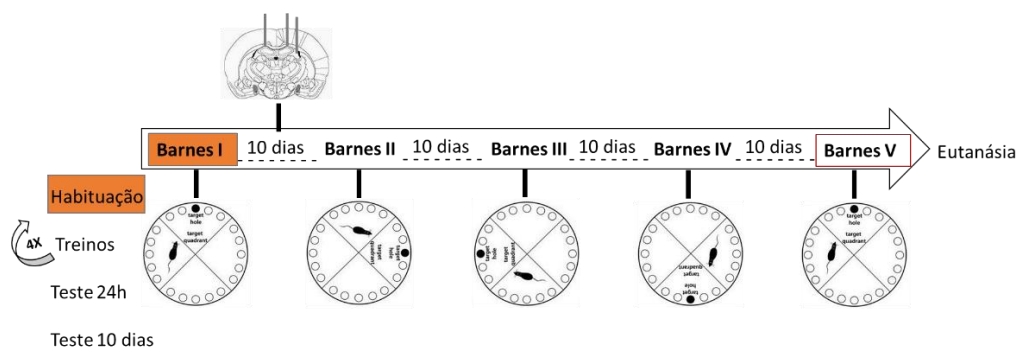


Figura 1: Delineamento experimental do capítulo I. Os animais foram submetidos a cinco sequências de Barnes (I a V) com intervalos de 10 dias entre elas. Os animais foram cirurgiados entre a primeira e segunda sequências. Cada uma contou com séries de quatro *trials* por dia, durante quatro dias (quatro treinos), teste 24h e reteste 10 dias. O Barnes I contou com uma sessão de habituação, no dia anterior ao início dos treinos. O Barnes V não apresentou o reteste 10 dias. Em cada sequência, a localização do esconderijo era fixa, mudando, apenas, de uma sequência para outra.

4.4 Resultados

4.4.1 Barnes I

Os parâmetros mostrados nas figuras 2 e 3 foram analisados ao longo do período de treino da primeira sequência realizada no labirinto de Barnes.

A ANOVA com medidas repetidas mostrou efeito das exposições (*trials*) para o parâmetro de distância total percorrida ($F_{4,58, 58,86} = 2,97, p = 0,022$), sem efeito de grupo ou interação entre os *trials* e o grupo, indicando uma diminuição da distância total percorrida ao longo dos *trials* que foi similar em ambos os grupos. O teste de pos hoc não identificou diferenças específicas entre os *trials* (Bonferroni, $p > 0,05$). Não verificamos diferenças significantes ao longo dos *trials*, efeito de grupo ou interação para os parâmetros de latência para acerto, latência para primeiro erro e erro secundário, nem para porcentagem de tempo no quadrante alvo ($p > 0,05$). Também não verificamos redução ao longo das sessões para os parâmetros de distância para acerto ou o aumento da distância até o primeiro erro ($p > 0,05$). Verificamos diferenças estatísticas quanto aos níveis de distância até o erro secundário, indicando redução nos *trials* iniciais com

aumento nas sessões finais, devido ao aprendizado ($F_{4,96, 64,47} = 2,68, p=0,029$), porém teste de pos hoc não indicou diferenças específicas entre sessões ($p>0,05$) (figura 2).

O teste de Friedman mostrou forte tendência a um efeito dos *trials* para o número de acertos ($X^2(15) = 26,64, p=0,05$), além de um efeito significativo dos *trials* no número de erros primários ($X^2(15) = 43,27, p<0,001$), indicando uma diminuição desse parâmetro ao longo das exposições. Considerando a análise do número de erros secundários ao longo dos *trials* vimos redução ao longo dos *trials* ($X^2(15) = 27,78, p= 0,018$). Entretanto testes de Wilcoxon não detectaram diferenças entre os primeiros *trials* (1, 2) e o último (16) (figura 3).

Na figura 4 são mostrados os parâmetros avaliados nos testes. Não foram observadas diferenças para esses mesmos parâmetros nos testes 24h e 10 dias, exceto nesse último para o número de erros secundários, indicando que o grupo implantado apresentou menor número que o grupo não-implantado (mediana implantados = 5,38, não-implantados=11, $U=7, p=0,013$).

BARNES I

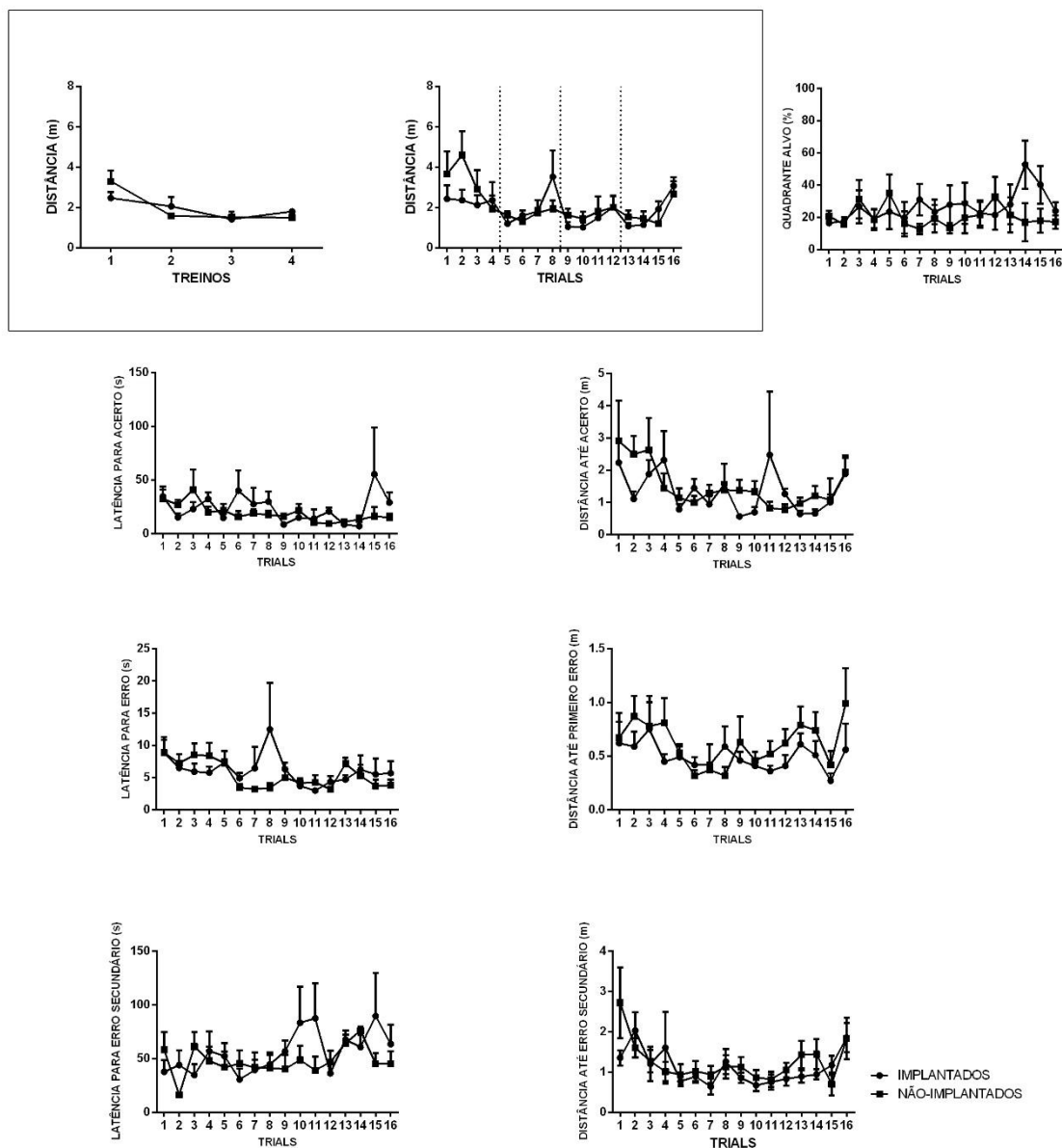
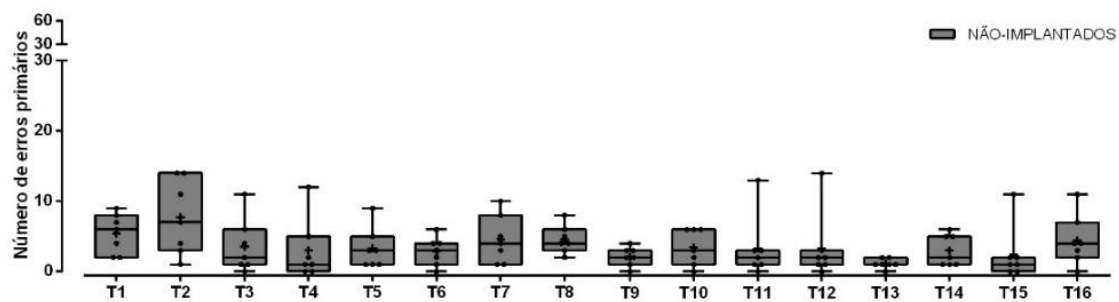
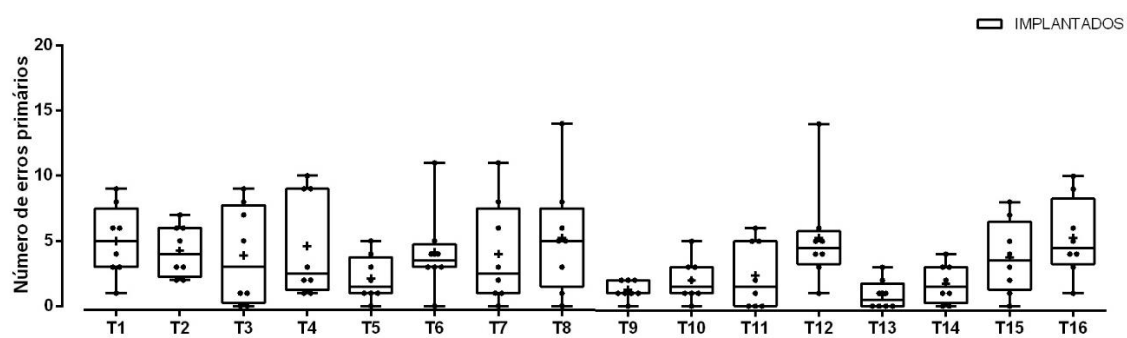
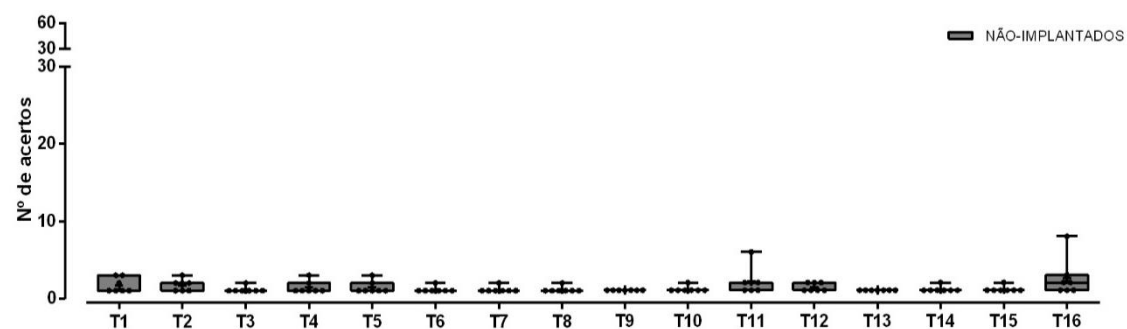
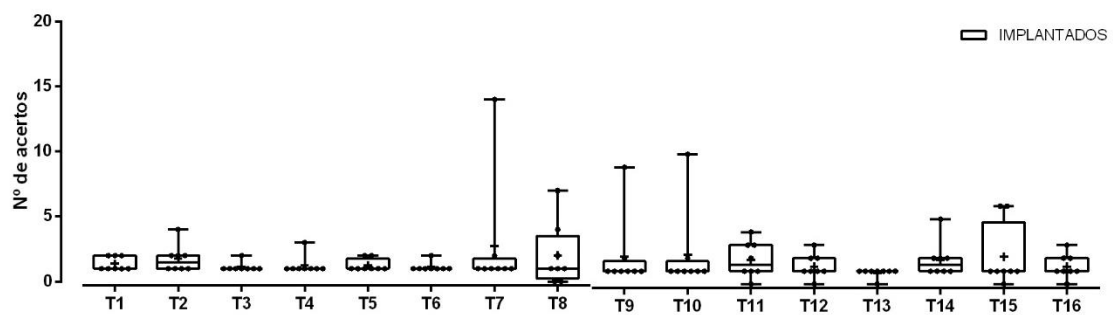


Figura 2: Distância avaliada por treino, para exemplificação e, por trial no Barnes I; demais parâmetros avaliados por trial. Não houve diferenças estatísticas ao longo das sessões, com exceção do efeito das exposições detectado para a distância total percorrida e a distância até o erro secundário (ANOVA de medidas repetidas). Linha tracejada no eixo X do parâmetro de distância por *trials*, indica o conjunto de quatro *trials* que representa um dia de treino. N implantados = 7, N não-implantados = 8.



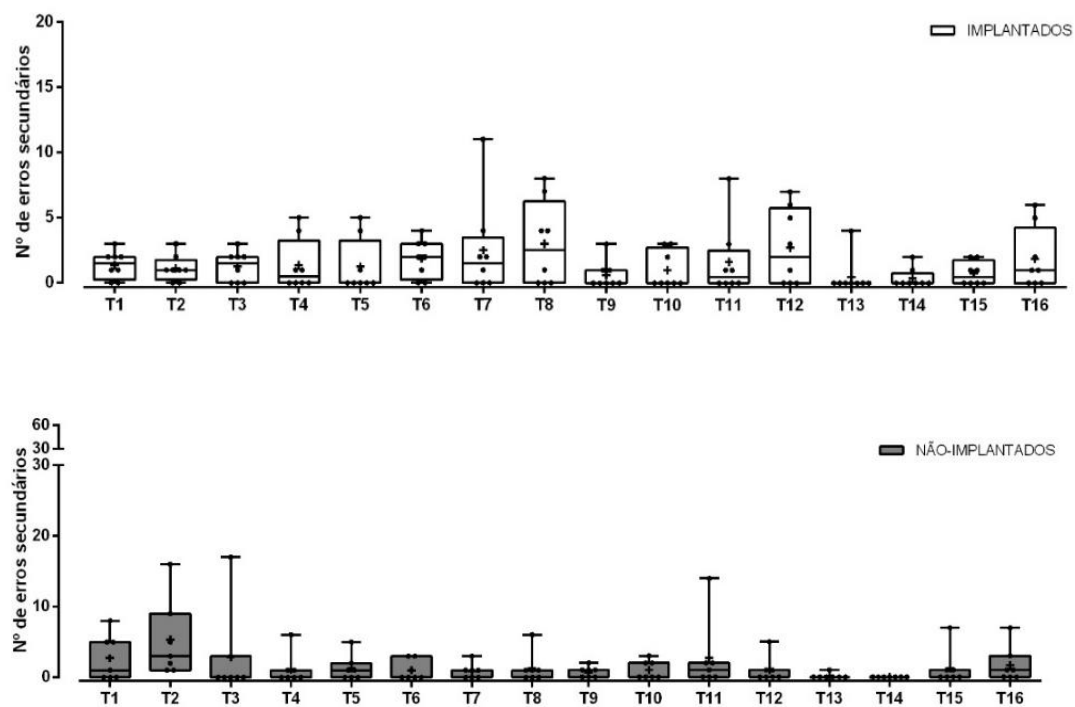


Figura 3: Parâmetros de número de acertos, número de erros primários e secundários, ao longo dos *trials* no Barnes I, mostraram diferenças ao longo dos *trials* (Friedman, $p \leq 0,05$). Representações gráficas box plot de baixo para cima: limite inferior, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3), limite superior, média (+), animal (·). N implantados = 7, N não-implantados = 8.

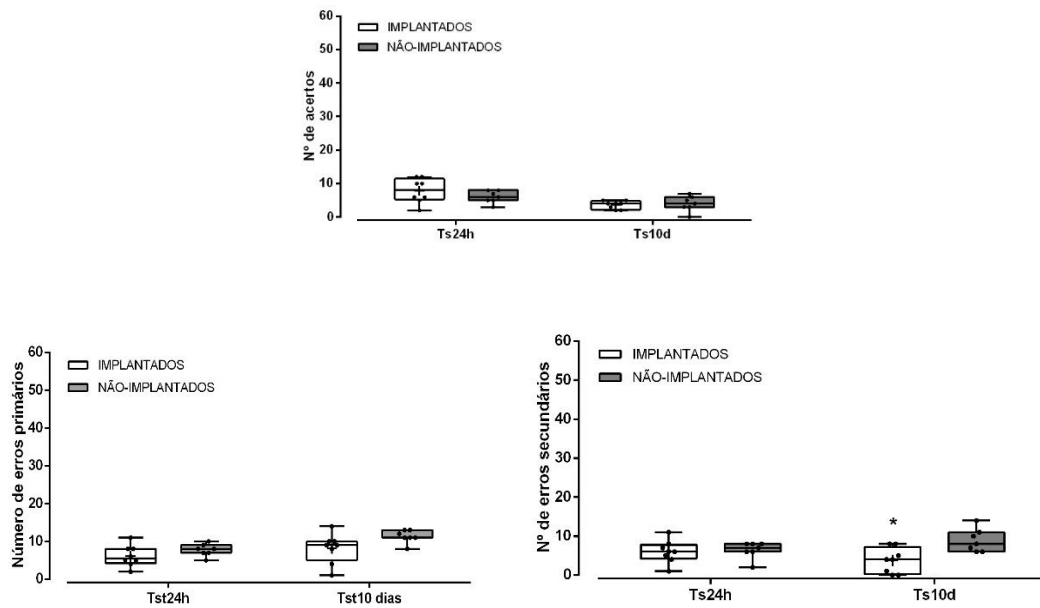


Figura 4: Parâmetros de número de acertos, número de erros primários e secundários, no Barnes I, nas sessões de teste 24h e 10 dias (Mann-Whitney, * $p < 0,05$ comparado ao grupo não-implantados). Representações gráficas box plot de baixo para cima: limite inferior, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3), limite superior, média (+), animal (·). N implantados = 7, N não-implantados = 8.

4.4.2 Barnes II

Os parâmetros mostrados nas figuras 5 e 6 foram analisados ao longo do período de treino da segunda sequência realizada no labirinto de Barnes.

Houve efeito das exposições para o parâmetro de distância total percorrida ($F_{5,79, 75,27} = 5,89, p < 0,001$), sem efeito de grupo ou interação entre os *trials* e o grupo. Pudemos observar que os *trials* 11 e 14 diferiram do trial 1, indicando redução significativa da distância (pos hoc de Bonferroni, $p < 0,05$). Apesar de não significativa, houve forte tendência ao longo das sessões de *trials* para redução na latência para acerto ($F_{1,87, 24,40} = 3,32, p = 0,055$). Verificamos redução ao longo das sessões para a distância para acerto ($F_{4,67, 60,72} = 9,14, p < 0,001$), indicando que *trials* finais (10, 11 e 14) diferem do primeiro trial (Bonferroni, $p < 0,05$) (figura 5).

Vimos efeito das sessões para porcentagem de tempo no quadrante alvo ($F_{4,58,59,58} = 7,337$, $p < 0,001$), indicando aumento desse parâmetro entre sessões finais (9 a 16) comparadas ao trial 1 (Bonferroni, $p < 0,05$). Vimos também efeito das sessões para latência para o primeiro erro ($F_{3,51,45,65} = 4,53$, $p = 0,005$). Além disso, a latência para o erro secundário não revelou efeito da sessão ($p > 0,05$). Não houve aumento da distância até primeiro erro, nem da distância até erro secundário ao longo das sessões ($p > 0,05$) (figura 5).

Não houve aumento ao longo dos *trials* para o número de acertos ($p > 0,05$), porém há efeito de redução do número de erros primários ao longo das sessões ($X^2(15) = 52,25$, $p < 0,001$) e para o número de erros secundários ($X^2(15) = 34,57$, $p = 0,003$). Os testes de Wilcoxon diferenças significativas entre os *trials* 1 e 16 nesses casos (figura 6).

Não foram observadas diferenças para esses parâmetros nos testes 24h e 10 dias, entre grupos (Mann-Whitney, $p > 0,05$, figura 7).

BARNES II

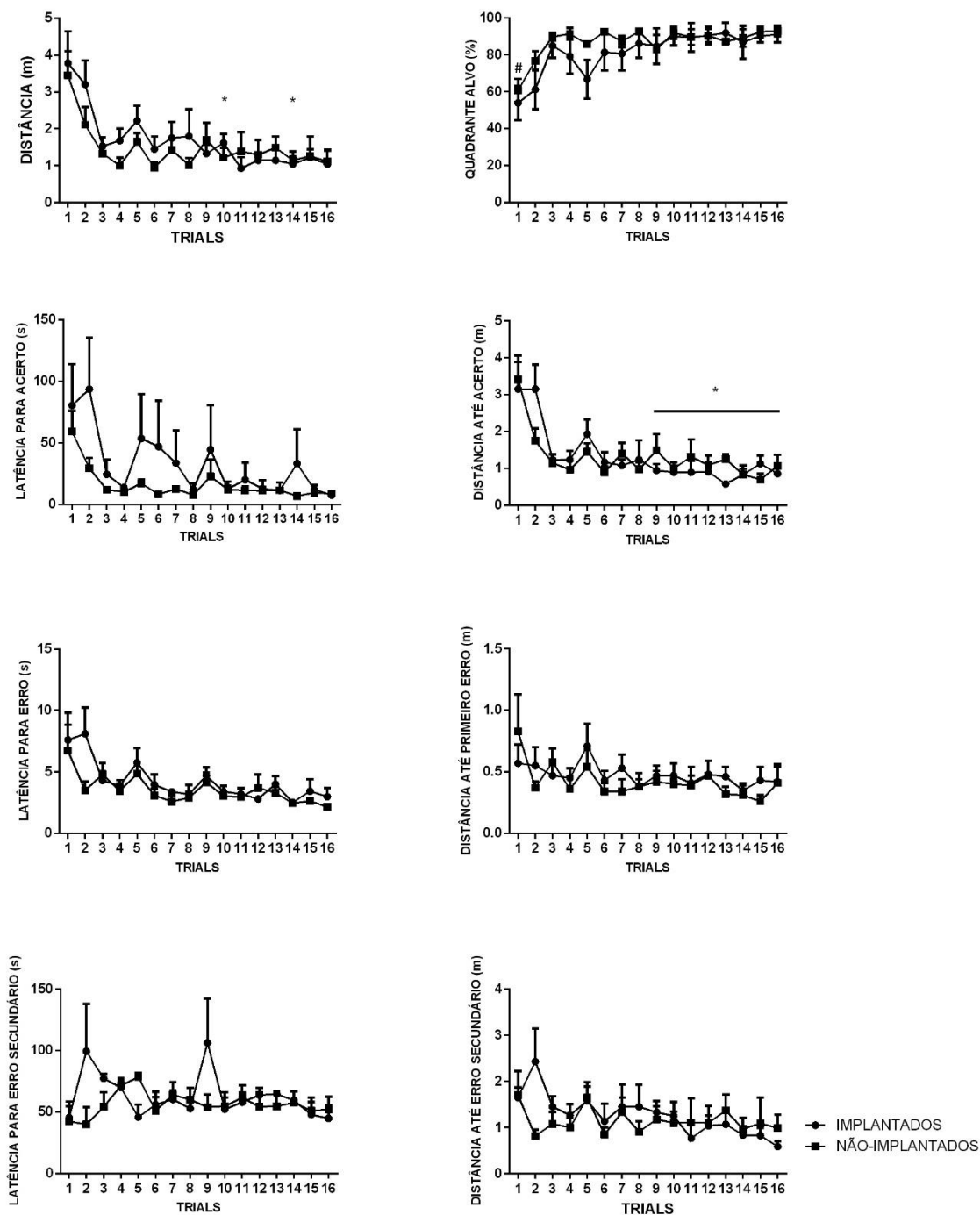
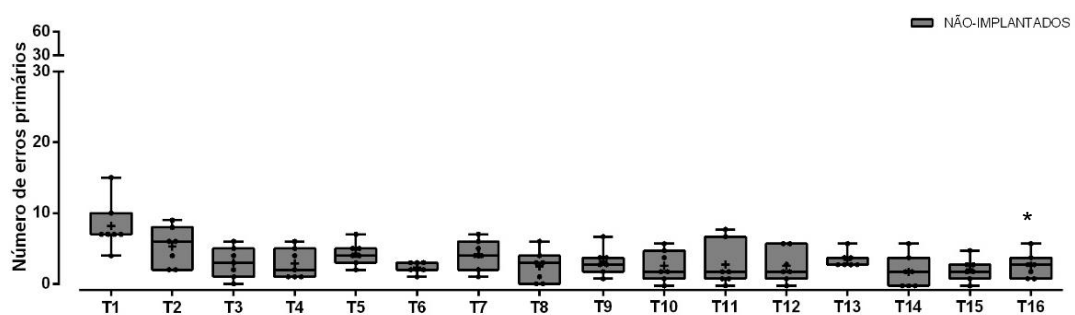
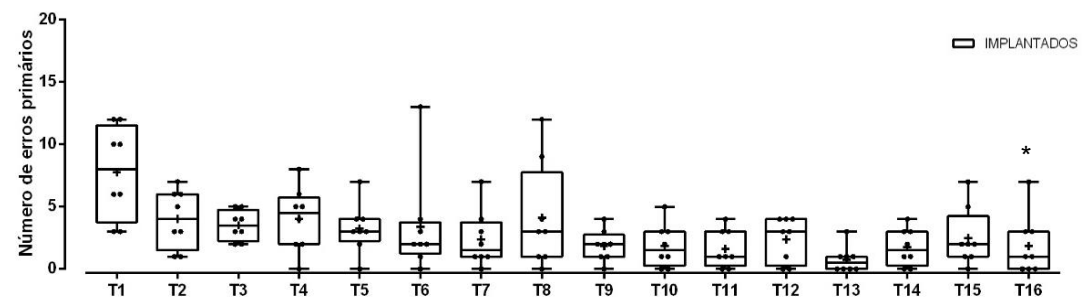
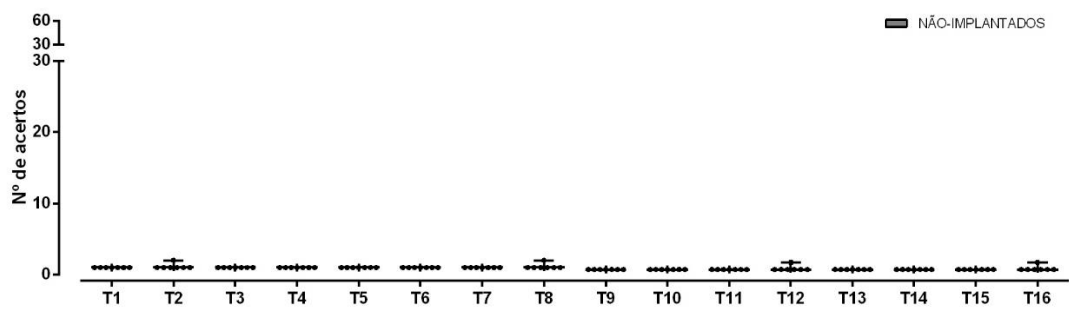
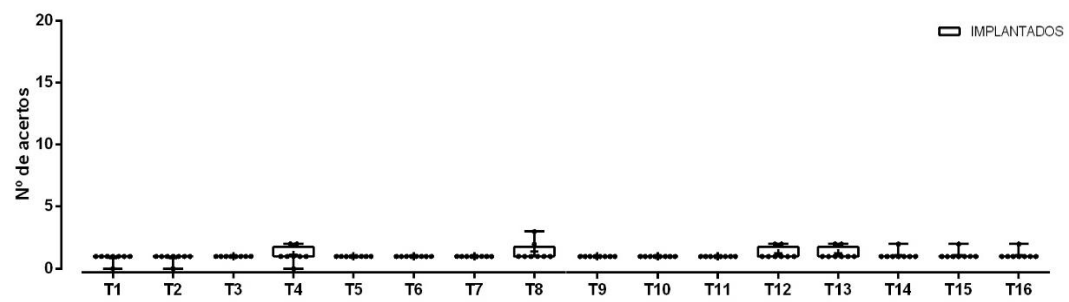


Figura 5: Parâmetros avaliados no Barnes II. Houve diferenças estatísticas ao longo das sessões para distância, distância para acerto e porcentagem de tempo no quadrante alvo, mas não para os demais parâmetros (ANOVA de medidas repetidas, pos hoc de Bonferroni, * $p < 0,05$ comparando-se ao primeiro trial; # comparando-se aos *trials* 9 a 16). N implantados = 7, N não-implantados = 8.



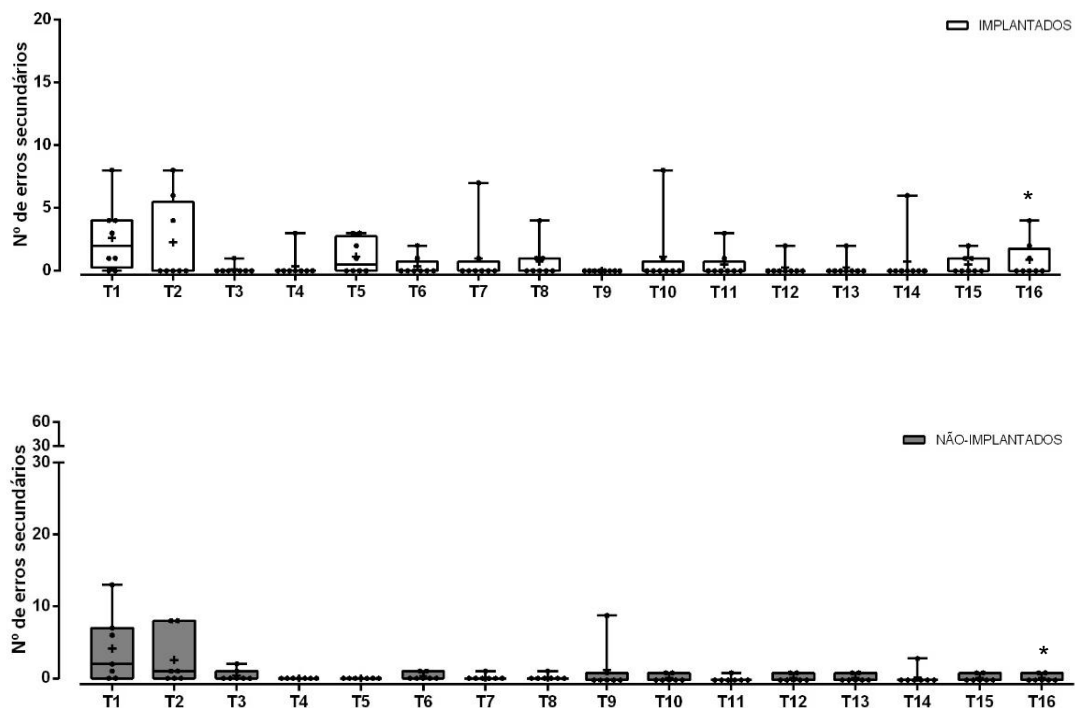


Figura 6: Parâmetros de número de acertos, erros primários e secundários, no Barnes II (Friedman, Wilcoxon, $*p < 0,05$ comparado ao trial 1). Representações gráficas box plot de baixo para cima: limite inferior, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3), limite superior, média (+), animal (·). N implantados = 7, N não-implantados = 8.

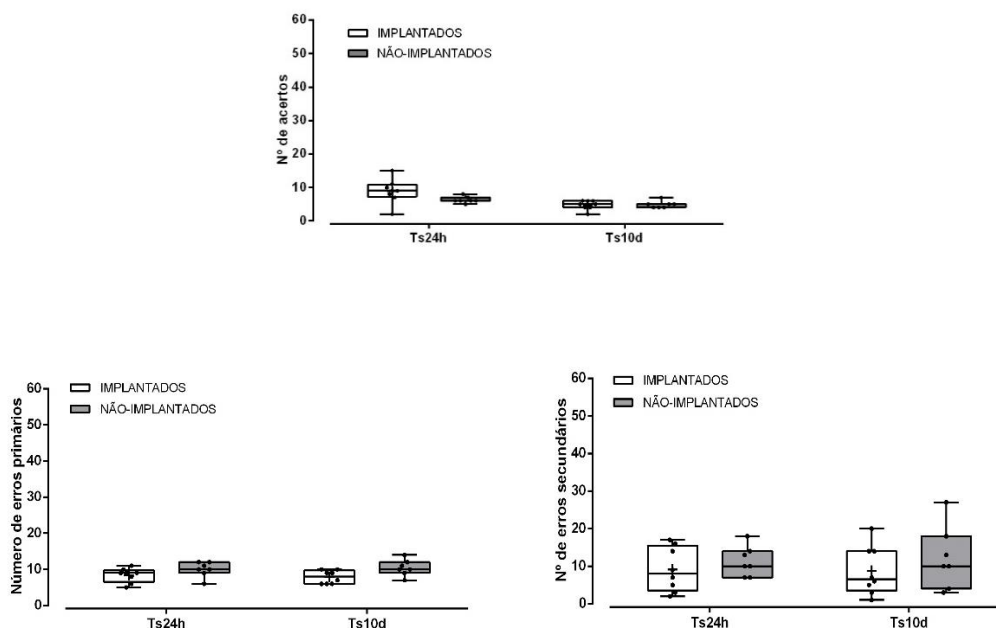


Figura 7: Parâmetros de número de acertos, número de erros primários e secundários, no Barnes II, nas sessões de teste 24h e 10 dias (Mann-Whitney, $p > 0,05$). Representações gráficas box plot de baixo para cima: limite inferior, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3), limite superior, média (+), animal (·). N implantados = 7, N não-implantados = 8.

4.4.3 Barnes III

A ANOVA mostrou efeito das exposições para o parâmetro de distância total percorrida ($F_{1,89, 24,65} = 8,881$, $p < 0,001$), sem efeito de grupo ou interação ($p > 0,05$), mostrando redução ao longo dos *trials*, porém sem diferenças significativas entre *trials* específicos pelo teste de pos hoc (Bonferroni, $p > 0,05$). A latência para acerto foi reduzida ao longo das sessões ($F_{1,91, 24,87} = 3,80$, $p = 0,038$), sem efeito de grupo ou interação ($p > 0,05$). Verificamos redução da distância para acerto ao longo das sessões ($F_{2,04, 26,60} = 7,032$, $p = 0,03$), sem apontamento da diferença entre *trials* (Bonferroni, $p > 0,05$) (figura 8).

Vimos efeito das sessões para porcentagem de tempo no quadrante alvo ($F_{4,42,57,50} = 33,16$, $p < 0,001$), indicando aumento desse parâmetro nas sessões finais (9 a 16) comparadas ao trial 1 (Bonferroni, $p < 0,05$), e para latência para o primeiro erro ($F_{2,66,29,46} = 5,12$, $p = 0,010$), sem apontamento de diferenças específicas entre os *trials* (Bonferroni, $p > 0,05$). Além disso, a análise da latência para erro secundário não revelou efeito da sessão ($p > 0,05$). Também não houve efeito de sessões na distância até primeiro erro ($F_{7,25,94,30} = 1,87$, $p = 0,079$), mas houve para a distância até o erro secundário ($F_{6,90,89,78} = 1,31$, $p = 0,010$), indicando redução ao longo das sessões (*trials* 3 e 16 diferem significativamente, Bonferroni, $p < 0,05$) (figura 8).

Houve redução ao longo dos *trials* para o número de acertos ($X^2(15) = 26,49$, $p = 0,025$), para o número de erros primários ($X^2(15) = 84,93$, $p < 0,001$) e secundários ($X^2(15) = 71,40$, $p < 0,001$), e testes de Wilcoxon mostraram diferenças significativas entre o trial 2 e o último ($p = 0,008$, $p < 0,001$, respectivamente, dados não representados em figuras).

Não foram observadas diferenças para esses parâmetros nos testes 24h e 10 dias, entre grupos (Mann-Whitney).

Os dados referentes ao número de acertos, erros totais, erros primários e secundários (*trials* ao longo dos treinos) e os parâmetros analisados nos testes nas sequências de exposições ao Barnes III a V mostraram perfis semelhantes ao Barnes II. Por esse motivo, embora as análises tenham sido realizadas e descritas no presente texto, optamos por não representar em figuras.

BARNES III

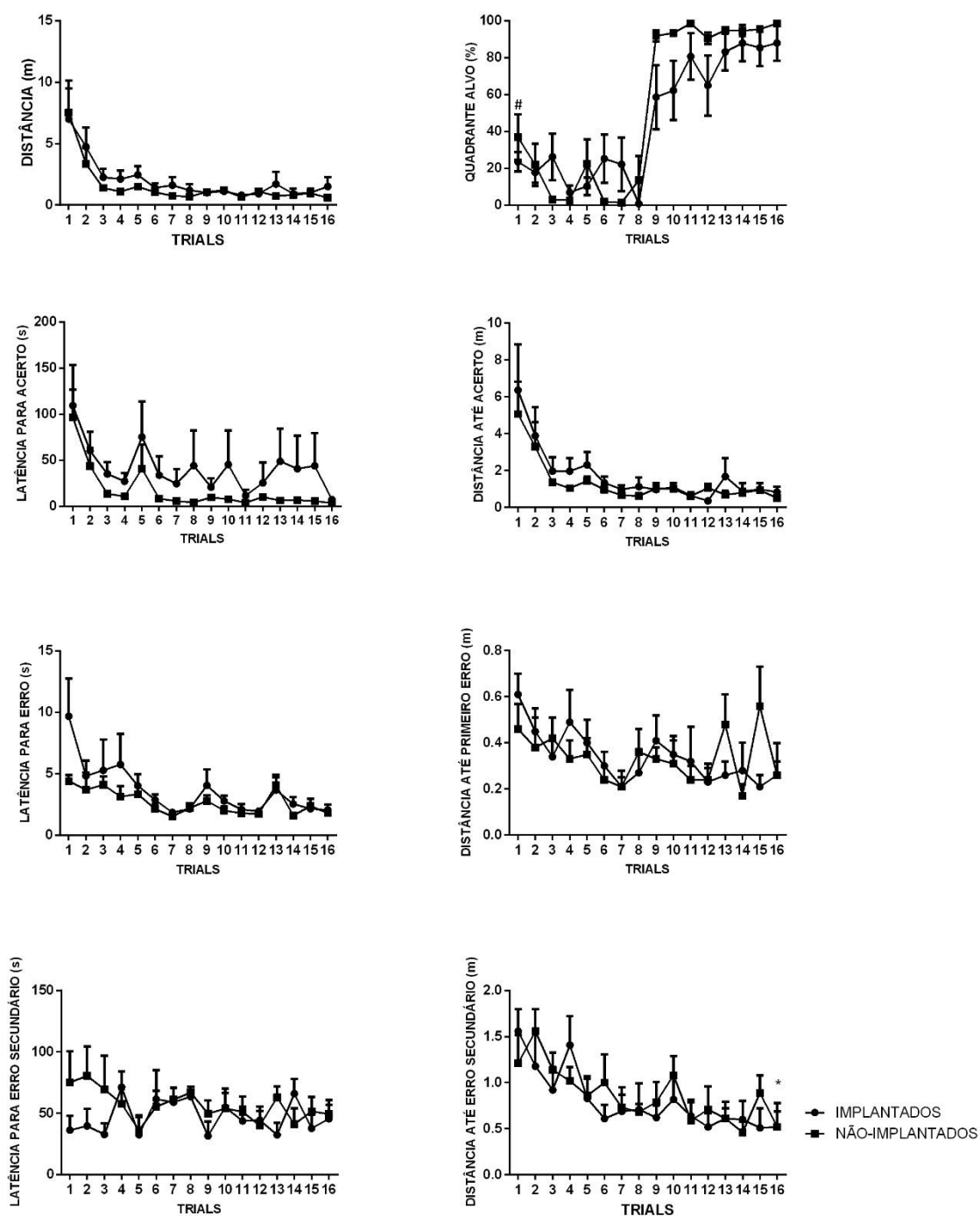


Figura 8: Parâmetros avaliados no Barnes III. Houve diferenças estatísticas ao longo das sessões para os parâmetros analisados, exceto latência para erro secundário (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, $*p < 0,05$, comparando-se ao primeiro trial; $\# p < 0,05$ comparando-se aos *trials* 9 a 16). N implantados = 7, N não-implantados = 8.

4.4.4 Barnes IV

A ANOVA mostrou efeito das exposições para o parâmetro de distância total percorrida ($F_{2,25, 27,00} = 14,28$, $p < 0,001$), com redução ao longo dos *trials*, indicando que os *trials* finais (8 a 16) diferem do trial 1 (Bonferroni, $p < 0,05$). A latência para acerto é reduzida ao longo das sessões ($F_{2,20, 26,46} = 8,08$, $p < 0,001$), porém sem indicação de diferenças específicas (Bonferroni, $p > 0,05$), sem efeito de grupo ou interação ($p > 0,05$). Verificamos diferenças ao longo das sessões para a distância para acerto ($F_{2,13, 25,57} = 15,47$, $p < 0,001$), indicando redução nos *trials* finais, 7 a 16, em comparação ao trial 1 (Bonferroni, $p < 0,05$) (figura 9).

Vimos efeito das sessões para porcentagem de tempo no quadrante alvo ($F_{3,57, 42,85} = 8,78$, $p < 0,001$), indicando aumento desse parâmetro a partir do trial 3 em diante comparadas ao trial 1 (Bonferroni, $p < 0,05$), e redução para latência para primeiro erro ($F_{4,83, 58,03} = 1,79$, $p < 0,001$), sem diferenças específicas entre os *trials* (Bonferroni, $p > 0,05$). Além disso, a latência para erro secundário não revelou efeito da sessão pela correção de Greenhouse-Geisser ($F_{5,53, 66,42} = 1,79$, $p = 0,119$), entretanto se assumirmos a esfericidade dos dados, vemos aumento ao longo da sessão. Houve efeito de sessões para a distância até o primeiro erro ($F_{7,23,86,82} = 2,44$, $p = 0,024$) e até o erro secundário ($F_{6,36, 76,41} = 3,052$, $p < 0,001$) ao longo das sessões, para esse último parâmetro, pudemos ver redução entre os *trials* 2 e 16 (Bonferroni, $p < 0,05$) (figura 9).

Houve diferenças ao longo dos *trials* para o número de acertos ($X^2(15) = 39,24$, $p < 0,001$), para o número de erros primários ($X^2(15) = 58,74$, $p < 0,001$) e secundários ($X^2(15) = 53,10$, $p < 0,001$), e testes de Wilcoxon posteriores mostraram que essas diferenças ocorreram entre o trial 1 e o último (16), indicando redução do número de erros primários e secundários ao longo das sessões (dados não representados em figuras).

Não verificamos diferenças para esses parâmetros nos testes 24h e 10 dias, entre grupos (Mann-Whitney, dados não representados em figuras).

BARNES IV

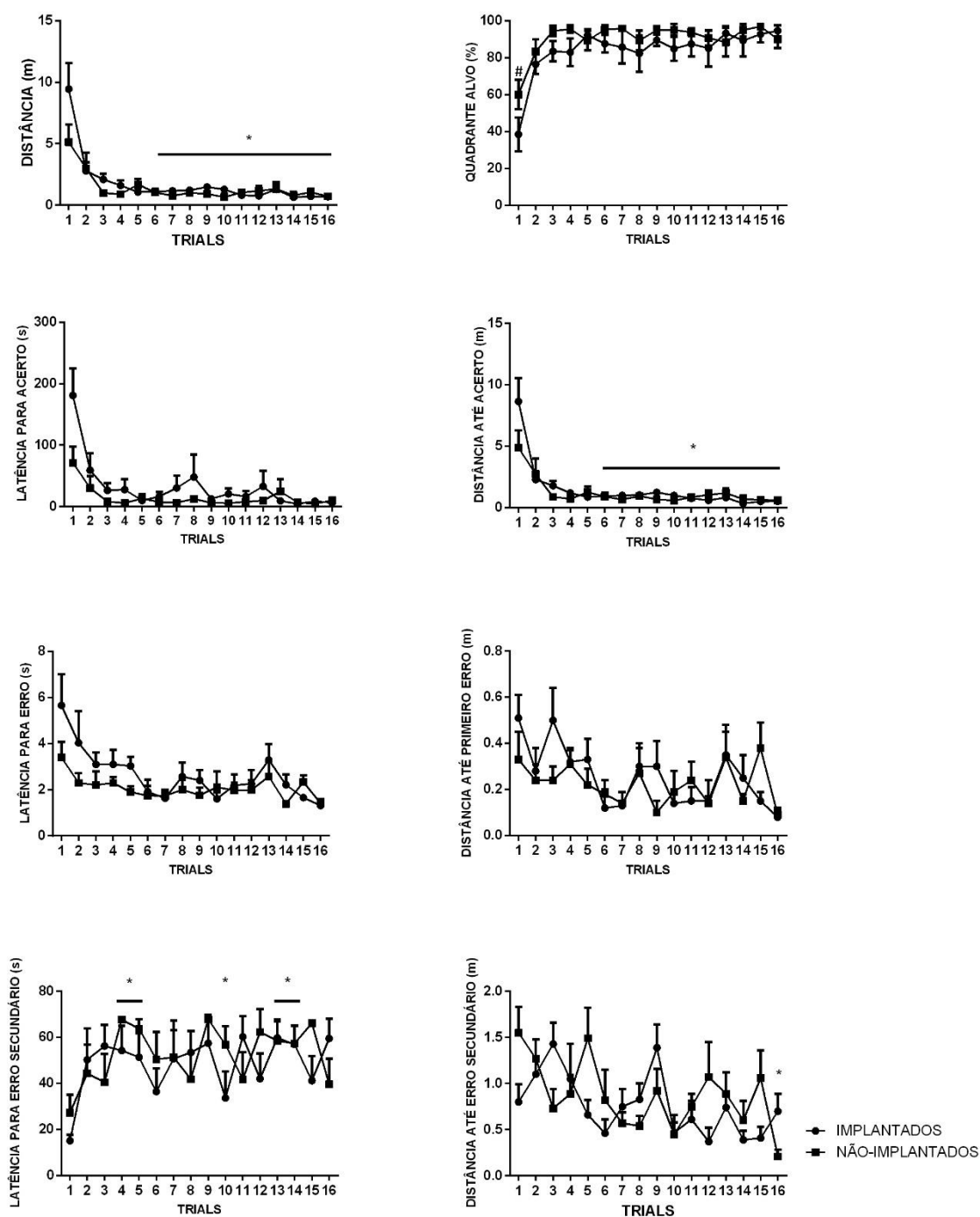


Figura 9: Parâmetros avaliados no Barnes IV. Houve diferenças estatísticas ao longo das sessões para todos os parâmetros analisados (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, * $p < 0,05$ comparado-se ao primeiro trial; # $p < 0,05$ comparando-se ao *trials* 3 a 16). N implantados = 7, N não-implantados = 8.

4.4.5 Barnes V

A ANOVA mostrou efeito das exposições para o parâmetro de distância total percorrida ($F_{4,28, 47,13} = 4,96$, $p < 0,001$), com redução ao longo dos *trials*, indicando que *trials* finais (10 a 16) diferem do trial 1 (Bonferroni, $p < 0,05$). A latência para acerto varia ao longo das sessões ($F_{3,07, 33,85} = 8,91$, $p < 0,001$), com forte tendência à redução entre *trials* finais (13-16) e o primeiro (Bonferroni, $p = 0,06$), sem efeito de grupo ou interação ($p > 0,05$). Verificamos também redução, ao longo das sessões, na distância para acerto ($F_{4,91, 54,08} = 6,39$, $p < 0,001$), indicando que trial 1 difere dos *trials* finais, 10 a 15 (Bonferroni, $p < 0,05$) (figura 10).

Vimos efeito das sessões para porcentagem de tempo no quadrante alvo ($F_{4,94, 54,41} = 6,75$, $p < 0,001$), indicando aumento desse parâmetro a partir do trial 5 até o 15, comparadas ao trial 1 (Bonferroni, $p < 0,05$). Houve efeito de sessão na latência para primeiro erro ($F_{5,21, 57,32} = 2,48$, $p = 0,04$), sem diferenças específicas entre os *trials* (Bonferroni, $p > 0,05$). Além disso, a latência para erro secundário não revelou efeito da sessão ($F_{5,61, 61,76} = 1,10$, $p = 0,359$). Não houve efeito da distância até primeiro erro ($F_{6,42, 70,67} = 1,90$, $p = 0,087$), mas sim forte tendência para redução da distância até erro secundário ($F_{5,93, 65,33} = 3,052$, $p = 0,053$) ao longo das sessões (figura 10).

Não houve diferenças ao longo dos *trials* para o número de acertos ($X^2(15) = 20,37$, $p = 0,142$), mas houve redução para o número de erros primários ($X^2(15) = 45,13$, $p < 0,001$) e secundários ($X^2(15) = 28,24$, $p = 0,014$), e teste de Wilcoxon mostrou redução entre os *trials* 1 e o 16 (Wilcoxon, $p = 0,007$ e $p = 0,023$, respectivamente), conforme também vimos em sequências anteriores (dados não representados em figuras).

No teste 24h, foi observada diferença entre os grupos apenas para o número de erros secundários, indicando menor número de erros efetuados pelo grupo implantado (Mann-Whitney, $p < 0,05$, figura 11).

BARNES V

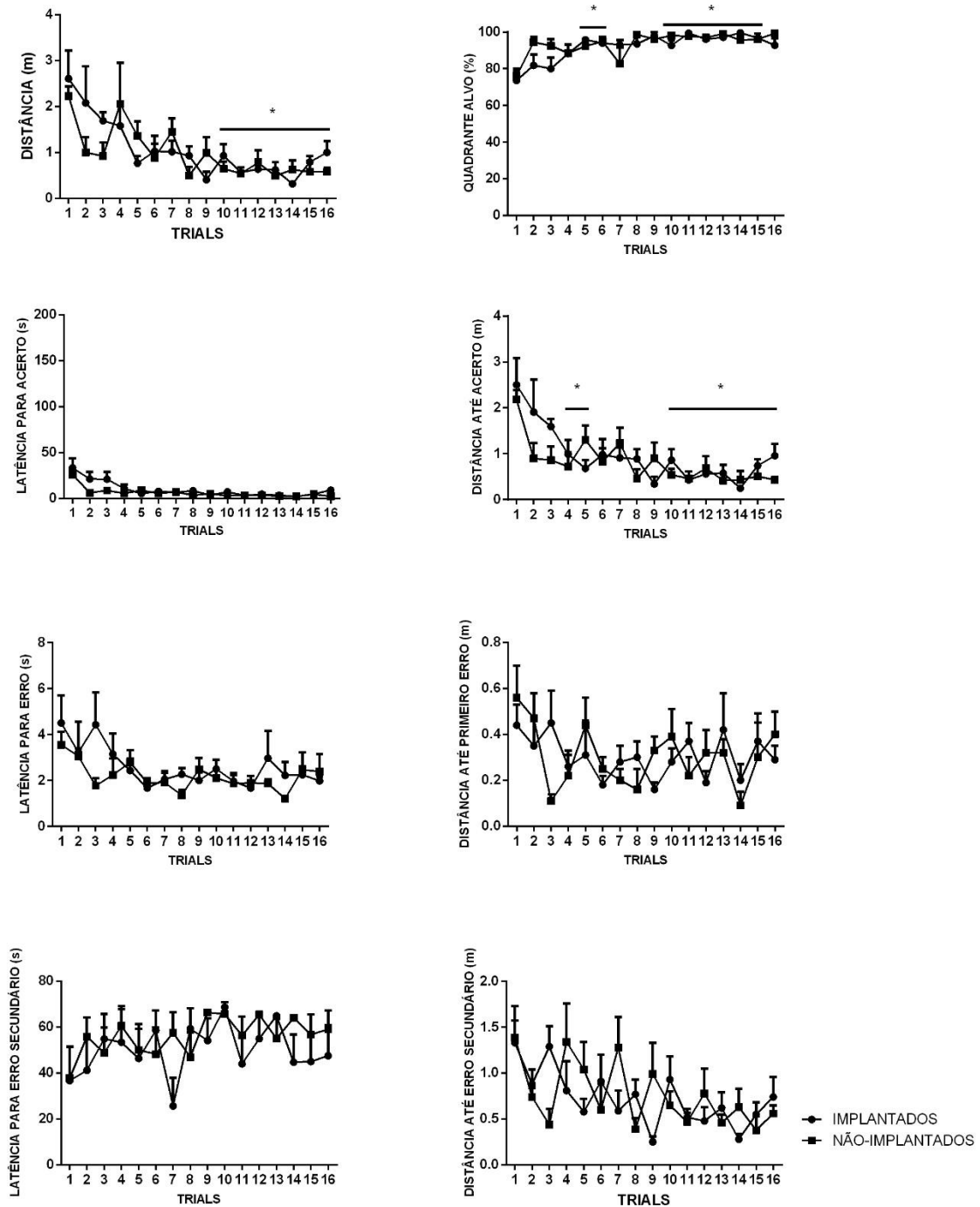


Figura 10: Parâmetros avaliados no Barnes V. Houve diferenças estatísticas ao longo das sessões para os parâmetros analisados, com exceção de latência para erro secundário e distância até o primeiro erro (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, $*p < 0,05$, comparado-se ao primeiro trial). N implantados = 7, N não-implantados = 8.

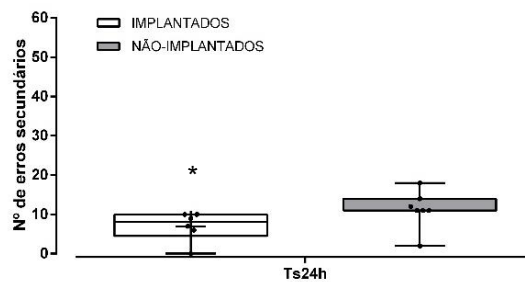


Figura 11: Número de erros secundários no Barnes V no teste 24h (Mann-Whitney, * $p < 0,05$ comparado ao grupo não-implantados). N implantados = 7, N não-implantados = 8.

4.4.6 Análise entre sequências no labirinto de Barnes

Realizamos análises entre as sequências de exposições para os testes com o intuito de verificar se há influência da repetição de sequências na evocação da tarefa, as quais são apresentadas na figura 12.

As análises por ANOVA comparando os testes de 24h de cada sequência indicam aumento da distância percorrida ao longo das sequências ($F_{4,40} = 7,739$, $p < 0,001$), com diferenças significativas nas sequências II e V comparadas à primeira (Bonferroni, $p < 0,05$). Não foram observados efeitos da repetição de sequências para os parâmetros de latência para o acerto ($F_{4,40} = 36,74$, $p = 0,217$) e latência para o primeiro erro ($F_{4,40} = 0,150$, $p = 0,962$).

Houve efeito da repetição de sequências para a distância total entre os testes 10 dias ($F_{3,36} = 17,90$, $p < 0,001$), com as sequências II a IV diferindo da primeira (Bonferroni, $p < 0,05$) e para esse parâmetro foi visto efeito de grupo ($F_{1,12} = 4,99$, $p = 0,045$), com o grupo de não-implantados apresentando maiores valores, independente da sequência. Há forte tendência para a latência para o acerto ao longo das sessões de testes 10 dias, porém não significava ($F_{1,8, 22,56} = 3,37$, $p = 0,055$). Por outro lado, o parâmetro de latência para o primeiro erro mostrou efeito da repetição de sequências para os testes 10 dias indicando redução ao longo das sequências ($F_{1,4, 17,18} = 11,08$, $p = 0,002$); a sequência I difere das demais (Bonferroni, $p < 0,05$).

A porcentagem de tempo no quadrante alvo sofre redução ao longo das exposições de testes 24 h ($F_{4,44} = 6,35$, $p < 0,001$) e 10 dias ($F_{3,36} = 12,91$, $p < 0,001$). Neste parâmetro,

também foi visto efeito de grupo para as análises de teste 24h entre sequências ($F_{1,11} = 7,015, p=0,023$), indicando que a porcentagem para o grupo implantado é superior ao não-implantado.

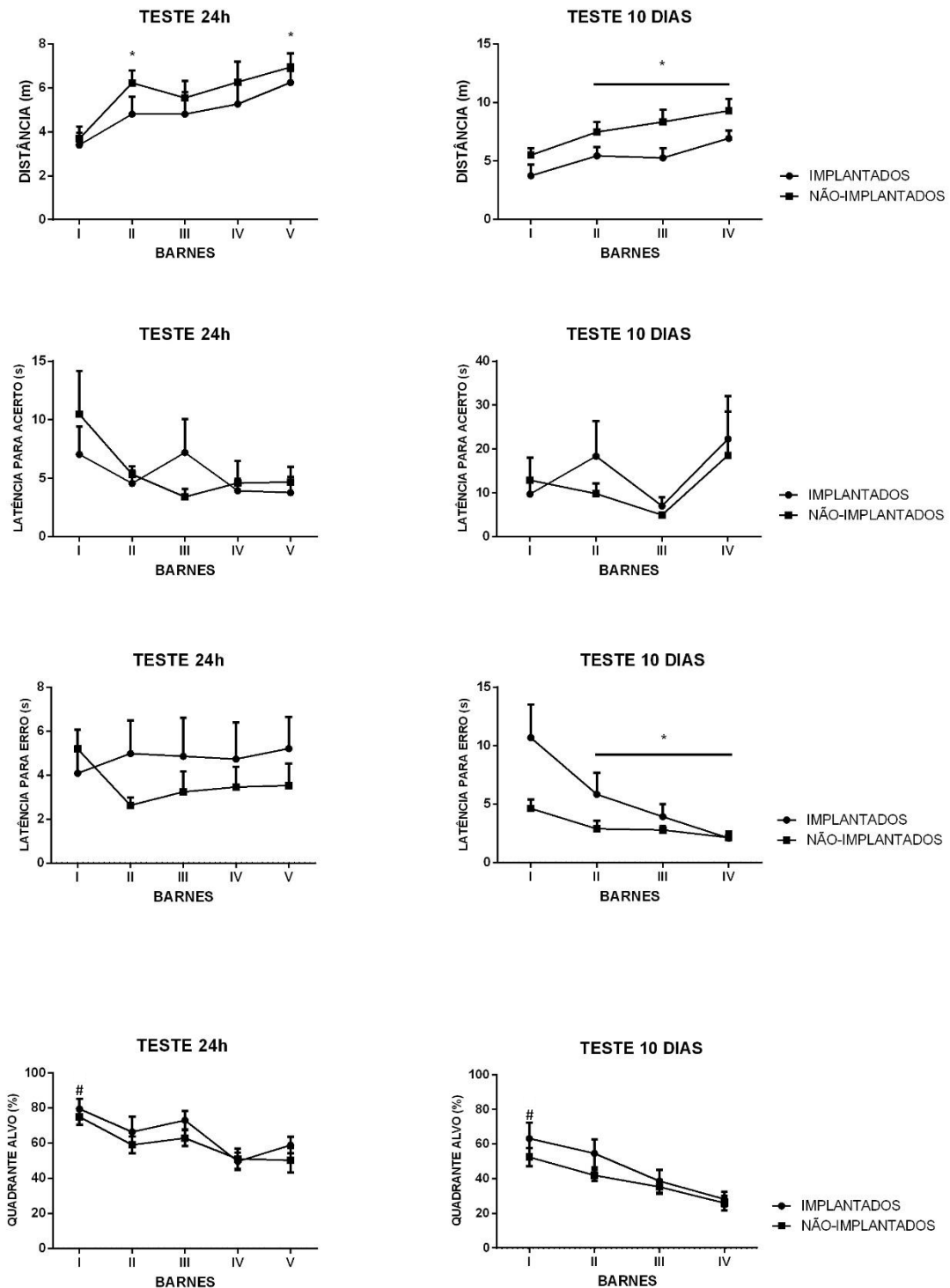


Figura 12: Comparação entre as sequências de labirinto de Barnes nos testes 24h e 10 dias. Houve efeitos da repetição de sequências para distância (24h e 10 dias), latência

para o primeiro erro (10 dias) e porcentagem de tempo no quadrante alvo (24h e 10 dias); e efeitos de grupo para distância (teste 10 dias) e para a porcentagem de tempo no quadrante alvo (teste 24h) (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, $*p<0,05$, comparado a primeira sequência; $^{\#}p<0,05$ comparando às demais sequências). N implantados = 7, N não-implantados = 8.

4.5 Discussão

Nossos dados para as cinco sequências de exposição mostraram reprodutibilidade nos parâmetros comumente utilizados na literatura, distância total percorrida, latência e distância para acerto, latência e distância para primeiro erro e para o erro secundário, bem como, porcentagem de tempo no quadrante alvo (Barnes, 1979, Sunyer et al., 2007, Pompl et al., 1999). A cada nova sequência de Barnes verificamos o aprendizado e a evocação dos animais, na maior parte dos casos sem diferenças entre os grupos com ou sem implantes intracerebrais, indicando que a cirurgia não promoveu lesão que inabilitasse os animais para a tarefa. Ao contrário, no único parâmetro de desempenho no qual houve diferença entre os grupos (número de erros secundários nas sessões de teste das sequências I e V e porcentagem no quadrante alvo na comparação dos testes entre sequências), pareceu haver um desempenho melhor dos animais implantados.

Na maioria das sequências realizadas, ambos os grupos apresentaram redução ao longo dos *trials* para os parâmetros de distância total percorrida no aparato, indicando habituação, bem como para a latência ao acerto e distância para o acerto, além disso houve aumento para a porcentagem de tempo gasto no quadrante alvo. Essas direções na apresentação dos parâmetros indicam a efetivação do aprendizado e evocação (Rojanathammanee et al. 2013, Barnes, 1979, Sunyer et al., 2007, Pompl et al., 1999). Os parâmetros latência e distância para os diferentes tipos de erro deveriam tender a aumentar ao longo das sessões. Entretanto nem sempre essas tendências se efetivaram, devido à multiplicidade de exposições, levando a diferentes tomadas de decisão pelos animais ao longo dos *trials* e devido à variabilidade intra-grupo.

Por outro lado, apesar da significância mostrada pelos testes estatísticos ao longo dos *trials* para cada parâmetro, muitas vezes, elas não puderam ser confirmadas por

comparações entre sessões específicas devido ao elevado número de comparações corrigidas por Bonferroni (Field, 2005).

Adicionalmente, verificamos que a tarefa pôde ser repetida com a efetivação de novos aprendizados a cada nova exposição, havendo, entretanto, alguma influência da sessão anterior numa nova exposição. Isso pôde ser averiguado nas avaliações dos parâmetros entre os testes das diferentes sequências, latência para primeiro erro no teste 10 dias e porcentagem de tempo nos quadrantes nos testes 24h e 10 dias. Para tais parâmetros, houve redução das medidas ao longo das diferentes exposições, indicando interferência da sessão anterior no novo aprendizado. Além disso, a distância total percorrida entre os testes apresentou aumento ao longo das exposições reforçando a interferência do aprendizado anterior, pois os animais ainda tentam atingir o esconderijo por evocar a localização anteriormente aprendida, aumentando a distância percorrida até descobrirem o novo local seguro (Barnes, 1979, Reiseirer et al. 2007, Sunyer et al., 2007).

Por outro lado, a constante exposição ao aprendizado mesmo quando o animal é exposto a mudanças no contexto, representadas aqui por uma nova localização do esconderijo a cada nova sequência de *trials* (Barnes de I a V), sem alterações na disposição das pistas distais, revela uma facilitação no aprendizado da nova sequência compara à anterior, configurando um aprendizado da regra (Reiseirer et al. 2007). Aqui pudemos averiguar tal aprendizado, no decaimento ao longo dos *trials* para o parâmetro latência e distância para o acerto, destacadamente nas exposições IV e V, nas quais os valores iniciais de cada nova exposição partem de um basal mais elevado, devido à lembrança/interferência do aprendizado anterior, mas rapidamente decaem no trial 2, atingindo um platô para uma resposta quase imediata para atingir o alvo, do trial seguinte para o último. O aprendizado da regra pode ser melhor visualizado, por exemplo, quando comparamos essas duas últimas exposições, na latência para acerto, verificando que os valores iniciais do Barnes IV são superiores ao Barnes V, ou seja, na exposição seguinte, os valores basais não crescem ao nível da anterior.

Reforçamos que, de forma geral, não houve diferenças de desempenho entre os grupos que passaram ou não pela cirurgia de implante de cânulas, com exceção de um menor número de erros secundários apresentado pelos animais implantados (teste 10 dias do Barnes I e teste 24h do Barnes V). Esse dado poderia indicar um melhor desempenho desses animais. Entretanto, destacamos aqui que os animais não-implantados apresentaram maior distância percorrida no aparato que os implantados ao longo das

sequências então essa diferença poderia ser um reflexo de uma menor motivação para explorar o aparato. De qualquer forma, é importante ressaltar que o objetivo do experimento era verificar se a cirurgia impediria a execução da tarefa a contento, o que não ocorreu.

Diante da reprodutibilidade do aprendizado verificado ao longo de sessões repetidas de aprendizados em Barnes e de o grupo com implante das cânulas não demonstrar piora de desempenho, concluímos que a tarefa pode ser repetida e que a cirurgia não prejudicou a sua execução.

5. Capítulo II

Avaliação de estratégias para solução do labirinto de Barnes por animais expostos ou não a pistas distais.

5.1 Introdução

O hipocampo é parte do lobo temporal, sendo responsável pela aquisição, codificação, estocagem e recordação de memórias (Pasternack, et al. 1992, Fanselow & Poulos, 2005, Kim & Fanselow, 1992, Maguire et al., 1998, Mizumori, Ragozzino, Cooper, & Leutgeb, 1999b, Nadel & Wilner, 1980, Smith & Mizumori, 2006, Suzuki & Eichenbaum, 2000), particularmente memórias do tipo-episódicas (Clayton & Dickinson, 1998), as quais podem ser verificadas por meio de tarefas espaciais (Moser et al., 1993, Moser et al., 1995, Morris et al., 1982, Zhang et al. 2002).

Em conjunção a estudos de circuitos neurais envolvendo atividade celular, eletrofisiologia e lesões, particularidades das características mnemônicas são atribuídas a diferentes sub-regiões hipocampais (Marr, 1971, O'Reilly & McClelland, 1994, Rolls, 1996, Shapiro & Olton, 1994, Tanila, 1999). Tais estudos suportam os achados de que subregiões hipocampais codificam aspectos distintos da aquisição e recordação de memórias episódicas (Marr, 1971, McNaughton & Morris, 1987, Rolls, 1989, Treves & Rolls, 1994, Kogan et al., 1997, Jones et al., 2001, Malleret et al., 2010). Portanto, o hipocampo age com uma função integrativa dessas regiões (CA1, CA2, CA3 e giro denteado) para formação e consolidação da memória, projetando saídas com informação para o córtex.

Células de lugar hipocampais codificam representações espaciais, métricas e topográficas do meio, as quais são modificadas, constantemente, por remapeamentos de mudanças espaciais. Esses remapeamentos resultam em modificações neuroanatômicas, moleculares e eletrofisiológicas nas células de lugar, por fim, refletem em alterações nas estratégias comportamentais (Schmidt, et al. 2012) de memória episódica e paradigmas espaciais (Guzowsky et al. 2001, Maviel et al., 2004, Teixeira et al., 2006).

O labirinto de Barnes é um aparato que serve ao estudo do aprendizado e memória espacial em roedores. Convencionalmente, os animais são direcionados por pistas distais, dispostas fora do aparato, para aprender e evocar o local seguro (Barnes et al., 1979, 1980, 1989, 1990, O’Leary & Brown, 2012, Harrison, et al. 2006), por meio de parâmetros de latência e distância ao esconderijo, número de pesquisas em buracos que não o alvo e porcentagem de tempo no quadrante que contém o local seguro (Sunyer et al., 2007, Rojanathammanee et al., 2013, Attar et al., 2013). Adicionalmente, o aparato permite a avaliação do tipo de estratégia adotada para atingir o objetivo de encontrar o local seguro (Bach, 1995, Harrison, et al. 2006, O’Leary & Brown, 2012). O labirinto de Barnes é frequentemente usado para investigações de prejuízo na memória espacial após manipulações experimentais no hipocampo, como estudos de lesão, farmacológicos, disfunções neuronais decorrentes da idade ou processo degenerativos (McNaughton et al., 1989, Fox et al., 1998, Paylor et al., 2001, Holmes et al., 2002, Deacon & Rawlins, 2002, Koopmans et al., 2003, Seeger et al., 2004, Barnes et al., 1979, Markowska et al., 1998, Pompl et al., 1999, Reiserer et al., 2007, O’Leary & Brown, 2009).

Animais transgênicos, aos 4 meses de idade, exibiram prejuízos cognitivos na tarefa de Barnes, utilizando um protocolo curto de sessões de treino (5 *trials*) em comparação a protocolo extenso (15 *trials*), o qual não foi capaz de evidenciar diferenças entre os grupos. Esse estudo indica que o correto delineamento experimental, reduzindo o reforço no aprendizado pode revelar diferenças sutis precocemente (Pompl et al. 1999, Attar et al. 2013). A repetida exposição ao aprendizado pode mascarar déficits, gerando uma associação geral a forma de executar a tarefa em aprendizado subsequentes, constituindo um aprendizado da regra geral (Reiserer et al., 2007).

Estudos anteriores apontaram que alterações no desenho experimental em tarefas espaciais, tais como, a redução do número de treinos no aprendizado ou o aumento de intervalo para a aplicação do teste no labirinto de Barnes (Pompl et al. 1999, Attar et al. 2013; Reiserer et al., 2007), além de investigações da execução sob diferentes contextos, na presença ou ausência de pistas distais, modificam a demanda cognitiva requerida para efetuar a tarefa (O’Leary et al., 2011). Isso resulta na execução de distintas estratégias para atingir o objetivo (Harrison et al. 2006) ainda que diferenças não possam ser identificadas por parâmetros habituais de desempenho no Barnes. Em nosso experimento, investigamos além dos parâmetros habitualmente usados para analisar a memória

espacial, as estratégias adotadas para solucionar a tarefa, sob a exposição ou não a pistas distais, em condições fisiológicas normais.

5.2 Objetivo

Estudar o desempenho nos parâmetros convencionais e o uso de estratégias no labirinto de Barnes em animais submetidos a dois diferentes contextos: exposição ou não a pistas distais.

5.3 Materiais e Métodos

Os ratos (n=9) foram divididos em dois grupos, denominados de condição espacial e não-espacial, sendo expostos a uma série de *trials* para o aprendizado da localização do esconderijo. Ambos os grupos passaram por uma série de aprendizado no labirinto de Barnes, constituída por uma sessão de habituação, 4 sessões de treinos (uma por dia) com 4 *trials* cada, e uma sessão de teste 24h após a última série de treinos, perfazendo 6 dias de exposição. Os procedimentos nas sessões foram seguidos como descritos nos métodos gerais. As paredes em redor do labirinto continham pistas espaciais e ambos grupos foram sujeitos ao aprendizado na condição de acesso a elas, diferindo apenas na sessão de teste 24h, na qual um dos grupos foi impedido de guiar-se pelas pistas distais, pois foram cobertas por cortinas pretas (condição não-espacial), enquanto o outro grupo teve acesso a elas (condição espacial) (Figura 12).

As análises comportamentais foram feitas pelos parâmetros anteriormente descritos: distância total percorrida, latência e distância para acerto, latência e distância para primeiro erro e para o erro secundário e porcentagem de tempo no quadrante alvo. Além disso, foram realizadas avaliações do traçado executado para atingir o objetivo (alvo), na sessão de teste, constituindo as estratégias classificadas como direta, seriada ou aleatória (Bach et al., 1995, Harrison et al., 2006), como já descrito anteriormente.

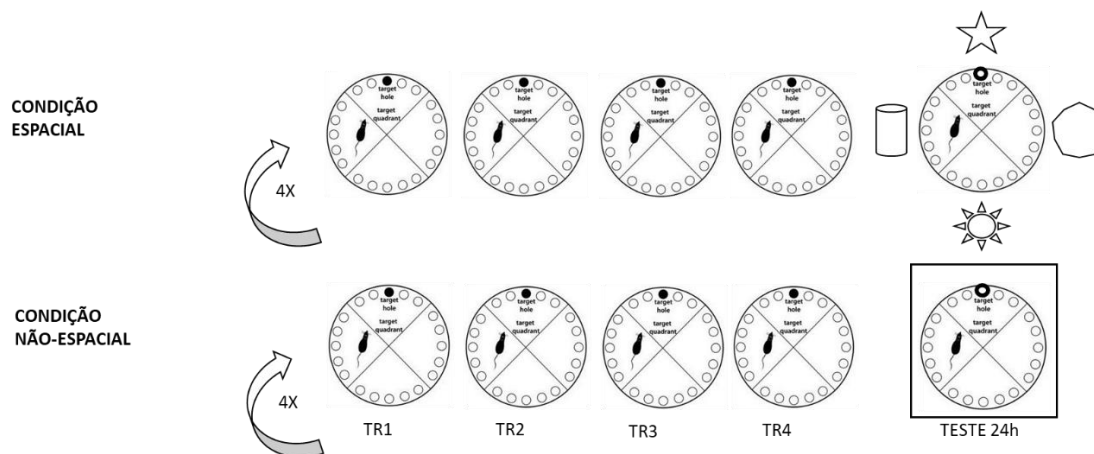


Figura 12: Delineamento experimental do capítulo II. Os animais foram submetidos a quatro sessões de treinos (quatro *trials* por dia, em quatro dias seguidos), 24h depois, a uma sessão de teste, que diferiu entre os grupos. Os animais foram sujeitos ao teste com as mesmas pistas distais dos treinos (grupo condição espacial) ou sem acesso a elas (condição não-espacial).

5.4 Resultados

A ANOVA de duas vias não mostrou efeito das exposições para o parâmetro de distância total percorrida ($F_{3,51, 60,10} = 2,19, p=0,099$), nem da latência para acerto ($F_{2,53, 22,77} = 1,14, p=0,264$). Vimos forte tendência ao efeito das sessões para diminuição da distância para acerto, evidenciadas entre os *trials* 8 e 15 ($F_{4,07, 36,71} = 20,69, p=0,050$, Bonferroni, $p<0,05$). Houve tendência ao efeito das sessões para a latência para o primeiro erro ($F_{4,41, 39,97} = 2,31, p=0,068$). A latência para o erro secundário mostrou elevação ao longo dos *trials* ($F_{5,63, 50,67} = 2,40, p=0,043$), porém não houve diferenças na comparação entre *trials* específicos (Bonferroni, $p>0,05$) (figura 13).

O teste T para amostras independentes não mostrou diferenças entre os grupos espacial e não-espacial no teste 24h para os parâmetros de distância percorrida ($t(9) = -0,124, p=0,904$), latência para erro secundário ($t(9) = -1,62, p=0,138$), latência para primeiro erro ($t(9) = -1,008, p=0,340$) e porcentagem no quadrante alvo ($t(9) = 0,399, p=0,700$). Porém, verificamos que o grupo da condição não-espacial apresentou maiores latência e distância para o acerto que na condição espacial ($t(9) = -2,407, p=0,039, r=0,61, t(9) = -2,893, p=0,018, r=0,62$), que foram acompanhados por tamanhos de efeito

elevados para ambos parâmetros ($r > 0,50$), indicando retardo na evocação pelo primeiro grupo (figura 14).

Não houve diferenças entre os grupos para o número de acertos ($U=5,50$, $p=0,110$), número de erros primários ($U=5,50$, $p=0,074$), nem secundários ($U=9,00$, $p=0,277$), no teste 24h (dados não representados em figuras).

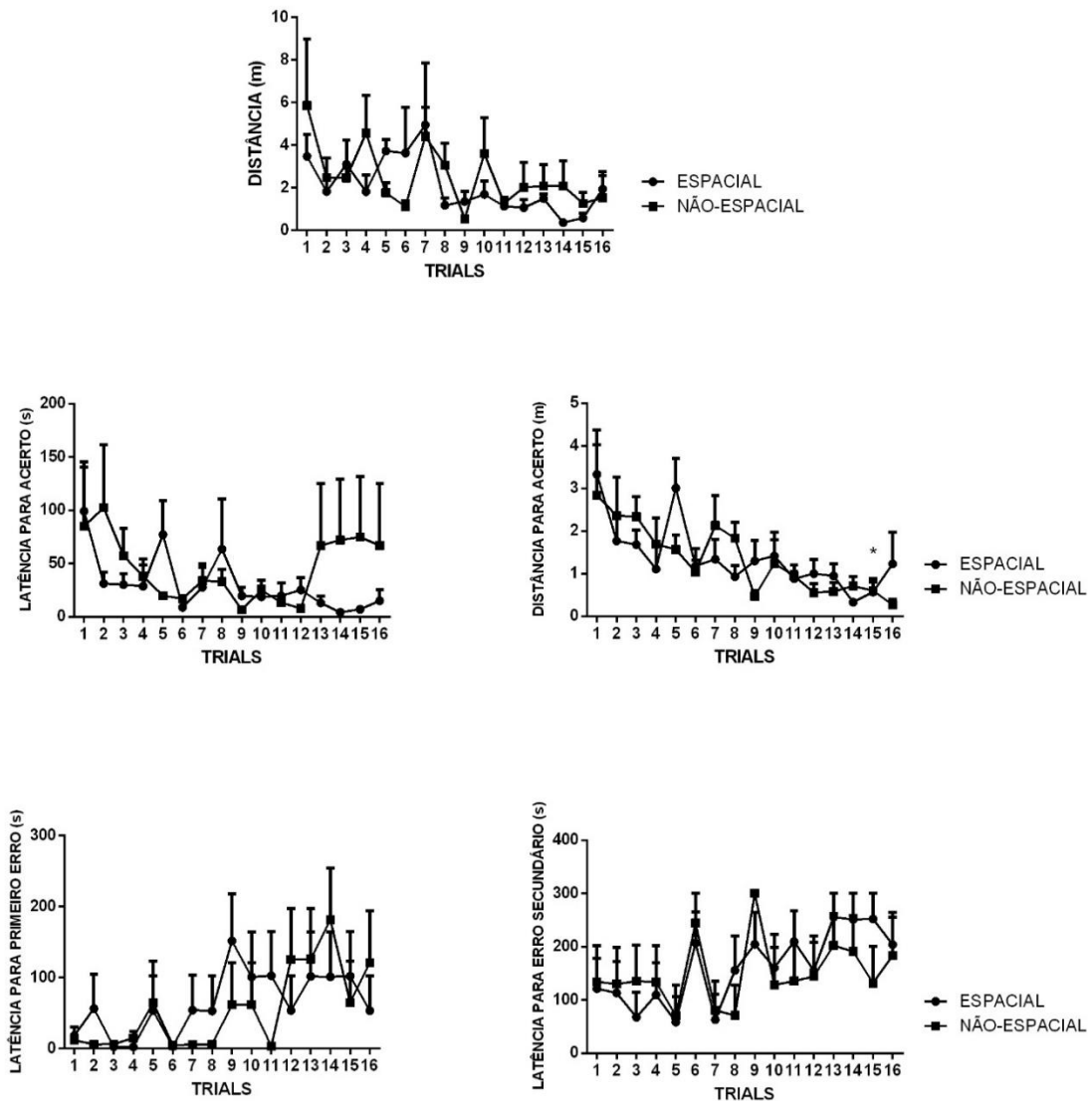


Figura 13: Parâmetros comparados aos longos dos *trials* entre grupos a serem testados na presença (espacial) ou ausência (não-espacial) de pistas distais. Não houve efeito significativo para distância total e latência para acerto. O efeito das sessões na distância para acerto, latência para primeiro erro e para erro secundário foi marginalmente significativo (ANOVA de medidas repetidas). * $p < 0,05$, comparado a trial 8 (Bonferroni). N grupo condição espacial = 6, N grupo condição não-espacial = 5.

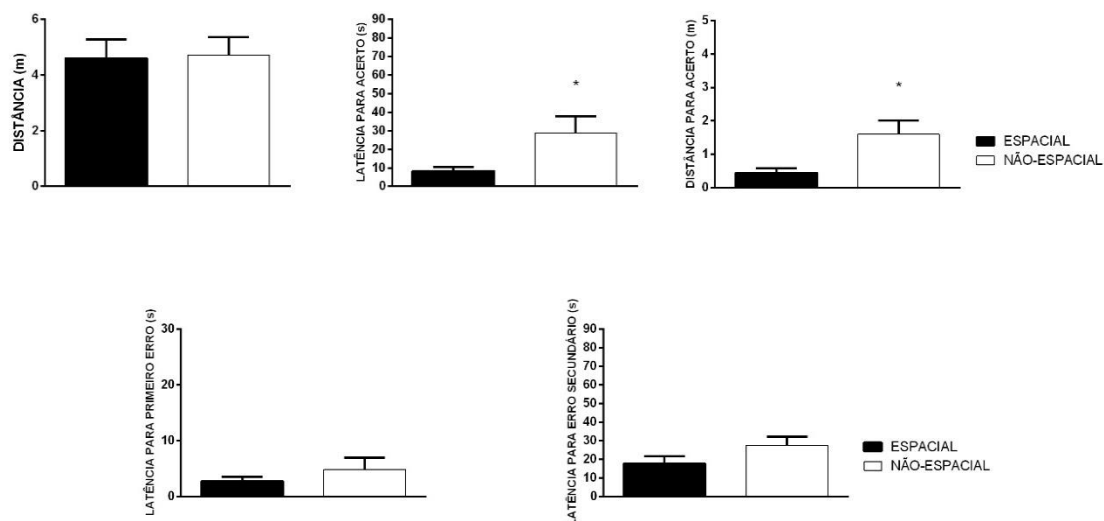


Figura 14: Parâmetros avaliados no teste 24h entre os grupos na presença (espacial) ou ausência (não-espacial) de pistas distais (teste T para amostras independentes, * $p < 0,05$ comparado à condição espacial). N grupo condição espacial = 6, N grupo condição não-espacial = 5.

A avaliação do uso de diferentes estratégias está mostrada na figura 15. As análises de uso de estratégias como primeira escolha revelaram um efeito marginal significativo: detectamos uma associação entre os grupos para a escolha entre estratégia direta ou as demais (não-direta). O grupo na condição não-espacial preferiu estratégias do tipo não-diretas (considerando-se as estratégias aleatória e seriada) comparado ao grupo da condição espacial. Ou dito de outra forma, o grupo espacial preferiu a estratégia direta em comparação ao grupo não-espacial ($\chi^2 (1) = 4.32$, $p = 0.054$, OR 1.97, 95% CI: 1.03 – 3.74). Nesse sentido, ainda para a escolha inicial, houve indicação de preferência, marginalmente significativa, para a estratégia aleatória pelo grupo submetido à condição sem pistas (não-espacial) comparado à condição com pistas no teste 24h ($\chi^2 (1) = 3.58$, $p=0.072$, OR 2.0, 95% CI: 0.972 – 4.116). O mesmo resultado foi verificado para estratégia seriada, tendo o grupo da condição não-espacial preferido essa estratégia comparado à espacial ($\chi^2 (1) = 3.58$, $p=0.072$, OR 2.0, 95% CI: 0.972 – 4.116).

Análises de porcentagem do uso de estratégias ao longo da sessão de teste para cada animal comparadas ao acaso (33%), mostraram que o grupo da condição não-espacial apresentou menor frequência de uso da estratégia do tipo direta ($t_4 = -3,214$,

$p=0,032$). Aplicando-se a correção de Bonferroni para esse resultado, verificamos que a significância para considerar o efeito seria $p<0,016$, portanto, trata-se de uma tendência do grupo na condição não-espacial ter menor preferência pela estratégia direta. Enquanto isso, o grupo da condição espacial não mostrou preferência para nenhuma estratégia comparada ao acaso (direta: $t_5 = -1,252$, $p=0,266$, aleatória: $t_5 = 0,879$, $p=0,419$, seriada: $t_5 = -1,306$, $p=0,248$).

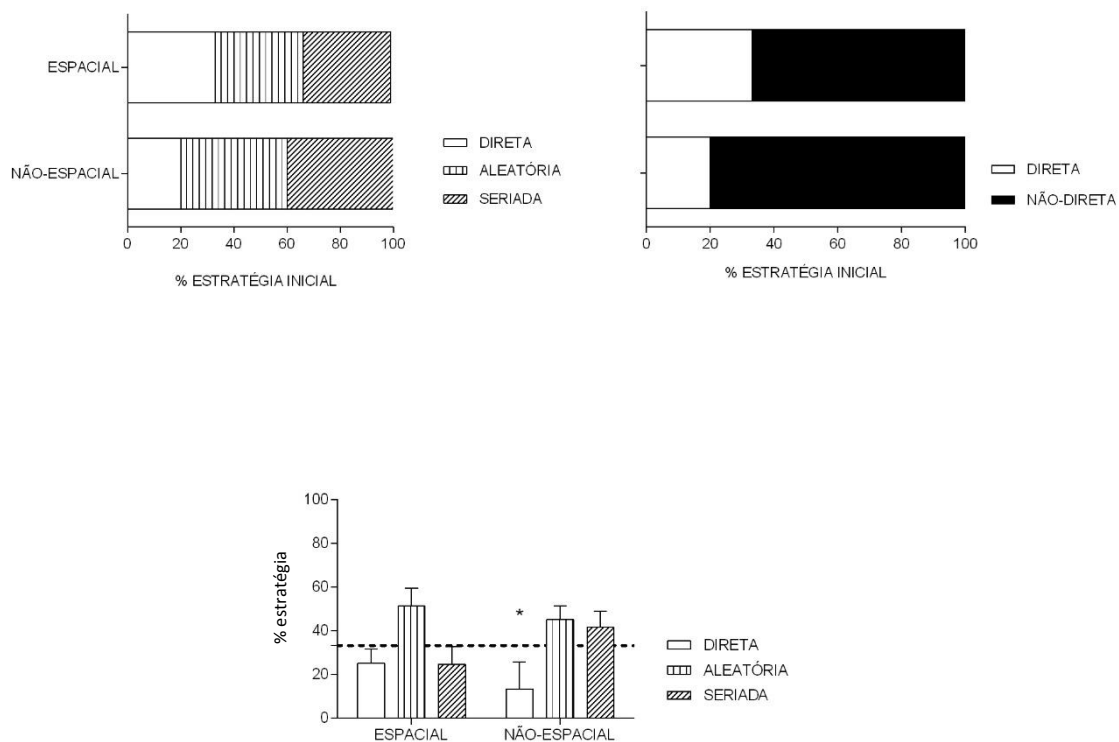


Figura 15: Análises de estratégias no teste 24h entre os grupos na presença (espacial) ou ausência (não-espacial) de pistas distais. Efeito marginal para a escolha inicial direta pela condição espacial comparada a não espacial (Teste exato de Fisher, X^2 , $p=0,054$). Comparações de cada estratégia com o acaso indicam tendência a menor preferência da estratégia direta pelo grupo na condição não-espacial (teste T de uma amostra, $*p=0,032$). N grupo condição espacial = 6, N grupo condição não-espacial = 5.

5.5 Discussão

Como previamente supomos, a presença ou ausência de pistas espaciais resultaram em diferenças comportamentais na solução da tarefa, ambos os grupos expostos tanto à condição espacial, quanto à não-espacial, foram capazes de realizar a tarefa, mas a solução foi obtida distintamente entre eles, usando estratégias preferenciais de escolha. Além disso, a versão não-espacial durante a fase de evocação apresentou retardo para atingir o alvo, representado pela elevada latência e distância até o alvo, no entanto, tais animais foram capazes de realizar a tarefa, usando preferencialmente, estratégias do tipo não-diretas.

Animais de ambas condições de exposição reduziram a distância e a latência, assim como aumentaram a porcentagem de tempo no quadrante alvo ao longo das sessões, sugerindo o aprendizado da tarefa (Barnes, 1979, Pompl, et al. 1999, Sunyer et al., 2007).

Contudo, realizaram a tarefa distintamente quanto à maneira de atingir o alvo na sessão de teste: animais submetidos a versão espacial, utilizaram tanto estratégias do tipo direta quanto não-diretas. Por outro lado, a retirada das pistas espaciais resultou na preferência por estratégias não-diretas. Esses achados sugerem que o desempenho e o tipo de estratégia adotado depende diretamente do acesso a pistas distais durante o aprendizado ou evocação (O’Leary & Brown, 2012). Quando os animais têm acesso a pistas distais, eles realizam navegação do tipo aloccêntrica, enquanto na ausência de pistas, usam outras estratégias na solução da tarefa, trocando para alternativas egocêntricas (Whishaw et al. 2001).

Além disso, nossos dados também corroboraram o achado de que a primeira estratégia adotada não persistiu ao longo dos *trials*. Como os animais não encontraram a solução por meio das pistas distais, devido à ausência do esconderijo na sessão de teste, eles trocaram a estratégia para outras alternativas na tentativa de atingir o objetivo. Estudos anteriores comprovaram esses apontamentos tanto no paradigma de Barnes, quanto na tarefa de esquiva discriminativa em labirinto em cruz (Harrison et al. 2006, Leão et al., 2016). Animais submetidos a pistas fixas exibiram navegação espacial, apresentando melhor desempenho comparado a protocolo de pistas variáveis ou ausentes. A análise de desempenho dos animais expostos a pistas fixas durante os *trials* mostrou a

troca da estratégia do tipo seriada para direta, enquanto aqueles sob aprendizado com pistas variáveis ou ausentes persistiram na estratégia seriada (Harrison, et al. 2006).

Aqui nós destacamos que mesmo com a retirada das pistas distais no teste e, a despeito do aumento da latência e distância para atingir o local do esconderijo, o grupo de condição não-espacial foi capaz de realizar a tarefa. Assim, sugere-se uma adaptação comportamental do desempenho em uma nova condição, possivelmente devido à formação de um mapa cognitivo durante as sessões de aprendizado sob pistas distais (Schimansk et al., 2013, Stouffel & Heisey, 2012, Tolman, 1948, O’Keefe & Nadal, 1978, Morris, 1983). Adicionalmente, a tarefa é de fácil execução, não demandando elaborada cognição, além do fato de que ameaças são ausentes, dessa forma, os animais puderam realizá-la por tentativa e erro, como observamos pelo retardo em atingir o alvo e pelo aumento do uso de estratégia do tipo seriada/aleatória acima do acaso, embora não estatisticamente significativa, na condição não-espacial.

Sujeitos submetidos à condição espacial do Barnes preferiram a estratégia direta como escolha inicial comparado aos animais de condição não-espacial. Em contraposição, o grupo não-espacial preferiu outros tipos de estratégia (não-diretas), como primeira escolha, corroborando que a estratégia adotada para atingir o alvo é dependente de pistas distais, como verificado no aprendizado e evocação em estudos anteriores (Barnes, 1979, Harrison, et al. 2006, O’Leary & Brown, 2012).

O contínuo reforço por exposição repetitiva a tarefa poderia solidificar o aprendizado e a memória dificultando a detecção de prejuízos. Considerando nossos dados, os efeitos marginais verificados nas análises de estratégias podiam ser referentes ao reforço repetitivo, por exposição a quatro *trials* por dia, em quatro dias consecutivos, como também atestaram estudos prévios (Clinton et al., 2007, O’Leary & Brown, 2009, Attar et al. 2013). Esses autores propuseram a redução do número de *trials* para revelar déficits cognitivos. Além disso, o aprendizado sob configuração espacial ou não, por si só, resultaria em recrutamentos de diferentes circuitos hipocampais (Jansen et al., 2010, Guzowski et al., 2001, Jarvis et al., 1995, Tischmeyer & Grimm, 1999). Outras condições como o avanço da idade e doenças poderiam influenciar o desempenho devido a disfunções hipocampais (Barnes, 1980, 1979, Pompl et al. 1999, Attar et al. 2013).

Estudo anterior mostrou que a estratégia inicial adotada não persistiu ao longo do tempo total de sessão sugerindo uma aleatorização na busca, com a pesquisa por novos

buracos, ao acaso, na tentativa de atingir o objetivo, por isso preconiza que os parâmetros avaliados no labirinto de Barnes sejam mensurados até a primeira visita ao alvo (Harrison, et al. 2006). Nesse experimento, vimos que a condição não-espacial apresentou menor preferência por estratégia direta que o acaso (33.33%), ou seja, foi menos utilizada do que uma busca ao acaso. Enquanto, o grupo espacial adotou estratégias ao acaso (direta, seriada e aleatória), falando em favor da randomização ao longo da sessão total.

Aqui nós investigamos como distintas demandas na evocação da memória espacial podem produzir diferenças na execução para atingir o objetivo da tarefa por meio da avaliação de estratégias. Além disso, verificamos que os animais podem desempenhar a contento a tarefa mesmo na ausência de pistas distais, sugerindo uma adaptação comportamental alternativa à navegação guiada por pistas espaciais. Sendo assim, seria interessante verificar se essa flexibilidade comportamental que ocorre em condições fisiológicas normais poderia ocorrer em condições neurodegenerativas ou de avanço da idade, para compensar possíveis déficits de memória espacial, o que foi investigado como mostrado mais adiante nesta tese.

6. Capítulo III

Efeitos da infusão intracerebral de peptídeos amilóides no desempenho de ratos no labirinto de Barnes

6.1 Introdução

A doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa caracterizada por disfunção na atividade neural, com perda de sinapses e neurônios causando progressivo declínio cognitivo acometendo o aprendizado e a memória (Braak, Jellinger, Braak, & Bohl, 1992) West et al., 1994; Eustache et al., 2004; (Sadek et al., 2004). Os principais marcadores patológicos são as placas amilóides e emaranhados neurofibrilares visualizados no tecido cerebral (Serrano-Pozo et al., 2011). A causa exata do Alzheimer permanece sob investigação, contudo a citotoxicidade tem sido relacionada ao acúmulo de peptídeos beta-amilóides (A β). O seu acúmulo é base da hipótese da cascata amilóide para o Alzheimer e precede o prejuízo cognitivo (Braak & Braak, 1991a); (Hardy & Selkoe, 2002); Desikan et al., 2012; Sperling et al., 2011; 2014).

Estudos recentes têm examinado o aprendizado e a memória espaciais em ambientes de realidade virtual em humanos (Iaria et al., 2009; Head & Isom, 2010; Plancher et al., 2010). Essa aproximação tem sido usada para mostrar disfunções cognitivas hipocampais similares aos estudos em roedores (McNaughton et al., 1989; Poucet et al., 1991; Pouzet et al., 2002; McDonald & White, 1993), evidenciando a importância do estudo de protocolos que permitam a detecção precoce do declínio (Foster et al., 2012).

Além disso, déficits espaciais detectados em tarefas de navegação têm sido propostos como sinal inicial da doença de Alzheimer, distinguindo essa condição de outros tipos de prejuízo cognitivo relacionados ao avanço da idade (Lithfous et al., 2013). Em contraposição a achados iniciais de prejuízo na memória espacial, déficits em outros tipos de memórias são evidenciados em estágios tardios da doença neurodegenerativa (Tarawneh & Holtzman, 2012; Sá et al., 2012(Li et al., 2016).

Estudos com pacientes de Alzheimer e em modelos animais mostraram mudanças neuropatológicas no hipocampo e córtex entorrinal (Braak & Braak, 1991b; Braak et al., 1992; Geula et al., 1998; Gomez-Isla et al., 1996; Terry et al., 1991; West, Coleman, Flood, & Troncoso, 1994; Yamada & Nabeshima, 2000). Adicionalmente, estudos *post mortem* em cérebros de humanos com a doença revelaram disfunções proeminentes em CA1 e subículo, enquanto o giro dentado e CA3 são relativamente preservados (Braak et al., 1992; Thal, Rub, Orantes, & Braak, 2002; West et al., 1994). O hipocampo e o córtex entorrinal são envolvidos no processamento do contexto espaço-temporal da informação (Antonova et al., 2009; Kukolja, Thiel, Wilms, Mirzazade, & Fink, 2009; LaFerla & Oddo, 2005; Moffat, Elkins, & Resnick, 2006). A desregulação dessas regiões é evidenciada com o avanço da idade e em patologias neurodegenerativas, prejudicando a memória espacial (Gandy et al., 2010; Genoux et al., 2002; Jones et al., 2001; Kogan et al., 1997; Magnusson et al., 2003). Tais achados se coadunam com os achados neuroquímicos e comportamentais no Alzheimer (Masters & Selkoe, 2012).

Tarefas espaciais têm sido empregadas para investigar declínio cognitivo em roedores e, dependendo do protocolo ou parâmetros avaliados, são capazes de detectar mudanças sutis no comportamento espacial. Isso permite a avaliação de leves prejuízos hipocampais e o progresso degenerativo inicial em modelos de Alzheimer. Na tarefa de Barnes, os animais são treinados para aprender a identificar e lembrar um local seguro, guiando-se por pistas espaciais (Barnes, 1979; Barnes, Eppich, & Rao, 1989; Barnes et al., 1990; Barnes, Nadel, & Honig, 1980); O'Leary & Brown, 2012; Harrison et al., 2006). No labirinto de Barnes, além dos parâmetros comumente usados de avaliação do aprendizado e da memória, tais como latência e distância até o alvo, porcentagem de tempo gasto no quadrante alvo e número de erros (Sunyer et al., 2007; Rojanathammanee et al., 2013; Attar et al., 2013), sutis alterações na forma de execução da tarefa, guiando-se por pistas espaciais, são reveladas pela avaliação de estratégias denominadas direta, seriada ou aleatória (Harrison et al., 2006). Dessa forma, o Barnes pode ser usado para investigar prejuízos na memória espacial em modelos de Alzheimer (Pompl et al., 1999; Reiserer et al., 2007; O'Leary & Brown, 2009).

Infusões intracerebrais de peptídeos A β constituem um reconhecido modelo de indução do Alzheimer (Kowall et al., 1991; Nitta et al., 1994; Yamada and Nabeshima, 2000; Kang et al., 2015). Contudo, a maioria dos estudos focam em estágios intermediários ou tardios da doença (Palop et al., 2003; Dickey et al., 2003; 2004;

Blanchard et al., 2008; Blanchard et al., 2009), diminuindo a contribuição desses modelos para a eficiência de potenciais terapêuticos.

No geral, os protocolos de modelos de infusão são conduzidos com altas concentrações ou longas durações de tratamento (Han et al., 2011; Tran et al., 2011; Cioanca et al., 2013), tais como a administração I.C.V. de A β 1-42 400pmol (Cioanca et al., 2013), de A β 1-40, 1 μ g/ μ l com agregação a 37°C (Han et al. 2011) ou 200pmol/5ml antes da exposição ao labirinto de Morris (Takeda et al. 2009). Apesar disso, apenas um estudo verificou o efeito da infusão de A β em camundongos no paradigma de Barnes, mostrando déficit no desempenho espacial após longo tratamento com 35 dias de infusão, sem investigações sobre diferenças nas estratégias utilizadas (Morzelle et al., 2016).

Aqui, nos propomos a investigar o efeito de diferentes doses infundidas intracerebralmente, de maneira repetida, em ratos sobre a memória espacial no labirinto de Barnes, ao longo do tempo, investigando inicialmente a condição basal e, a seguir a possível progressão da neurotoxicidade sobre o comportamento. Avaliamos, ainda, se a infusão de A β foi capaz de aderir ao parênquima cerebral, o que caracterizaria um importante aspecto de validação do modelo. Posteriormente, realizamos uma exposição ao Barnes com alterações no protocolo de infusão e execução da tarefa para investigar possíveis alterações comportamentais sutis, cujos efeitos comportamentais fossem similares ao déficit espacial inicial no curso da doença de Alzheimer.

6.2 Objetivo

Verificar os efeitos da infusão beta amilóide, por meio de diferentes protocolos, sobre o desempenho de ratos no labirinto de Barnes. Parte dos resultados deste capítulo compõe o artigo aceito para publicação (ver anexo).

6.3 Experimento I

Curva de dose dos efeitos da infusão intracerebral de peptídeos A β em ratos submetidos a três sequências de exposições ao labirinto de Barnes.

6.3.1 Materiais e métodos

Realizamos três sequências de Barnes, cada uma com o aprendizado de um novo esconderijo, seguindo o protocolo descrito anteriormente. Cada sequência foi composta por 4 *trials* por dia, durante 4 dias, perfazendo, portanto, 4 treinos, mais um teste após 24h e um resteste após 10 dias. Inicialmente, 37 ratos Wistar machos de 6 meses de idade foram submetidos a uma sequência de Barnes, sem distinção entre eles. Nessa primeira sequência foi realizada a sessão de habituação. A seguir, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas bilaterais em CA1 (AP: - 4.2 mm; LL: \pm 3.0 mm and DV: - 2.5 mm) uma no ventrículo lateral (I.C.V.; AP: - 1.0 mm; LL: \pm 1.8 mm e DV: - 3.3 mm), e divididos em quatro grupos: salina, A β 30pmoL, A β 100pmoL e A β 300pmoL. As microinjeções foram realizadas com bomba de infusão e microseringa de 10 μ L (Hamilton Company), conectadas a agulhas (26-gauge) e inseridas no cérebro dos animais por meio das cânulas guias, infusão de 1 μ L/dia, a uma taxa de 1 μ L/min por sítio.

O tratamento teve duração de 15 dias. No primeiro dia de tratamento foi injetado 1microL em cada sítio (bilateralmente em CA1 e I.C.V.), no experimento I, capítulo III, posteriormente, o volume de infusão por sítio foi alterado para 0,5 microL, nos protocolos dos experimentos II, capítulo III e no experimento do capítulo IV. Do 2º ao 15º dias, a solução foi infundida somente I.C.V., 1 vez ao dia. A segunda sequência de Barnes foi iniciada no dia da 11ª infusão, e finalizou junto com as infusões, ou seja, o teste 24h da segunda sequência ocorre no dia da 15ª infusão. A terceira sequência iniciou-se 10 dias após a segunda exposição ao Barnes. Devido à alta mortalidade dos animais com as doses maiores apenas animais dos grupos A β 30pmoL e salina foram submetidos à imunohistoquímica, após perfusão, para detecção dos peptídeos A β (figura 16).

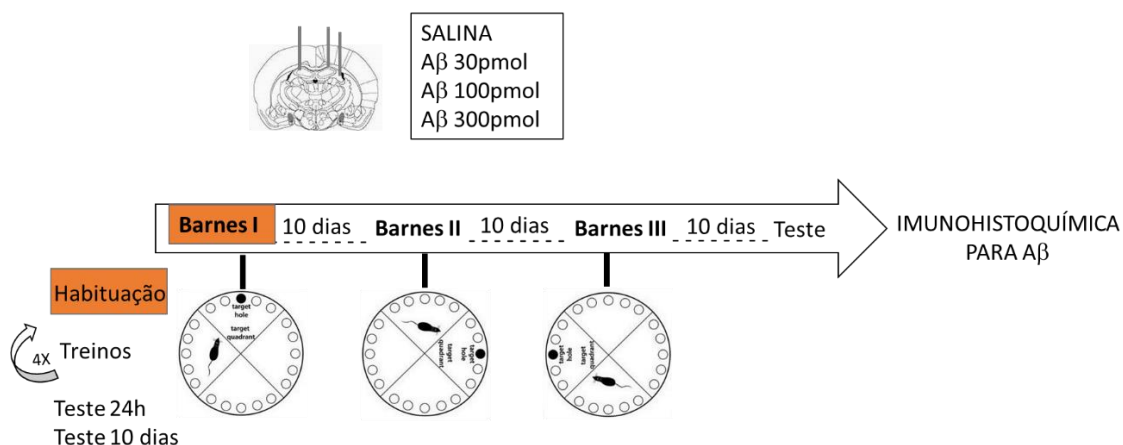


Figura 16: Delineamento do experimento I, capítulo III. Os animais foram submetidos a três sequências de Barnes com intervalos de 10 dias, conforme descrito na sessão 6.3.1. No intervalo entre a primeira e segunda sequências, os animais foram submetidos a implantação de cânulas, bilateral CA1 e unilateral I.C.V., sendo infundidos por 15 dias (primeiro dia em CA1 e I.C.V.; nos dias seguintes, apenas I.C.V.), perfazendo os grupos salina, A β 30, A β 100 e A β 300. A segunda sequência de Barnes iniciou-se após a 11^a infusão e finalizou após a 15^a com o teste 24h. Ao final dos experimentos comportamentais, os animais foram eutanasiados para realização de microtomia e imunohistoquímica para peptídeos A β .

6.3.2 Resultados

Taxa de sobrevivência

A taxa de sobrevida ao tratamento por infusão intracerebral de peptídeos A β está mostrada na tabela 1.

Tabela 1: Sobrevida de ratos infundidos intracerebralmente com diferentes concentrações de A β diariamente por 15 dias.

Grupo	N inicial	N final	% sobrevida
Salina	13	8	66,67
A β 30 pmol	13	6	46,15
A β 100 pmol	5	1	20
A β 300 pmol	6	3	50

N= número de animais, contabilizados até o teste 24h do Barnes III.

6.3.2.1 Barnes I

A ANOVA mostrou efeito das exposições para o parâmetro de distância total percorrida ($F_{5,24, 188,82} = 2,41, p = 0,035$), e as diferenças específicas entre os *trials* são vistas nos finais comparados ao primeiro (Bonferroni, $p < 0,05$). Também vimos efeito dos *trials* para latência para acerto ($F_{7,54, 271,60} = 6,839, p < 0,001$), também com diferenças específicas dos finais comparados ao primeiro ($F_{8,92, 321,22} = 5,112, p < 0,001$; Bonferroni, $p < 0,05$). Não verificamos diferenças ao longo das sessões para os parâmetros de latência para primeiro erro ($F_{3,5, 128,75} = 1,87, p = 0,125$) e para o erro secundário ($F_{5,18, 186,81} = 0,68, p = 0,799$) (figura 17).

Observamos efeitos dos *trials* pelo teste de Friedman quanto ao número de acertos ao longo das sessões ($X^2(15) = 35,89, p = 0,002$), porém essas diferenças não são encontradas entre os dois primeiros *trials* comparados ao último (Wilcoxon, $T = 39, p = 0,683$; $T = 22, p = 0,371$). Também houve efeito no número de erros totais ao longo dos *trials* ($X^2(15) = 72,46, p < 0,001$), essas diferenças residem comparando-se os dois primeiros *trials* ao último (Wilcoxon, $T = 63, p < 0,001$; $T = 97, p = 0,002$) (figura 18).

O teste T para amostras pareadas mostrou que a latência para o acerto foi maior no teste de 10 dias em comparação ao teste de 24h ($t_{36} = -7,21, p < 0,001$), mas o mesmo não ocorreu para a distância total ($p > 0,05$) (figura 19).

BARNES I

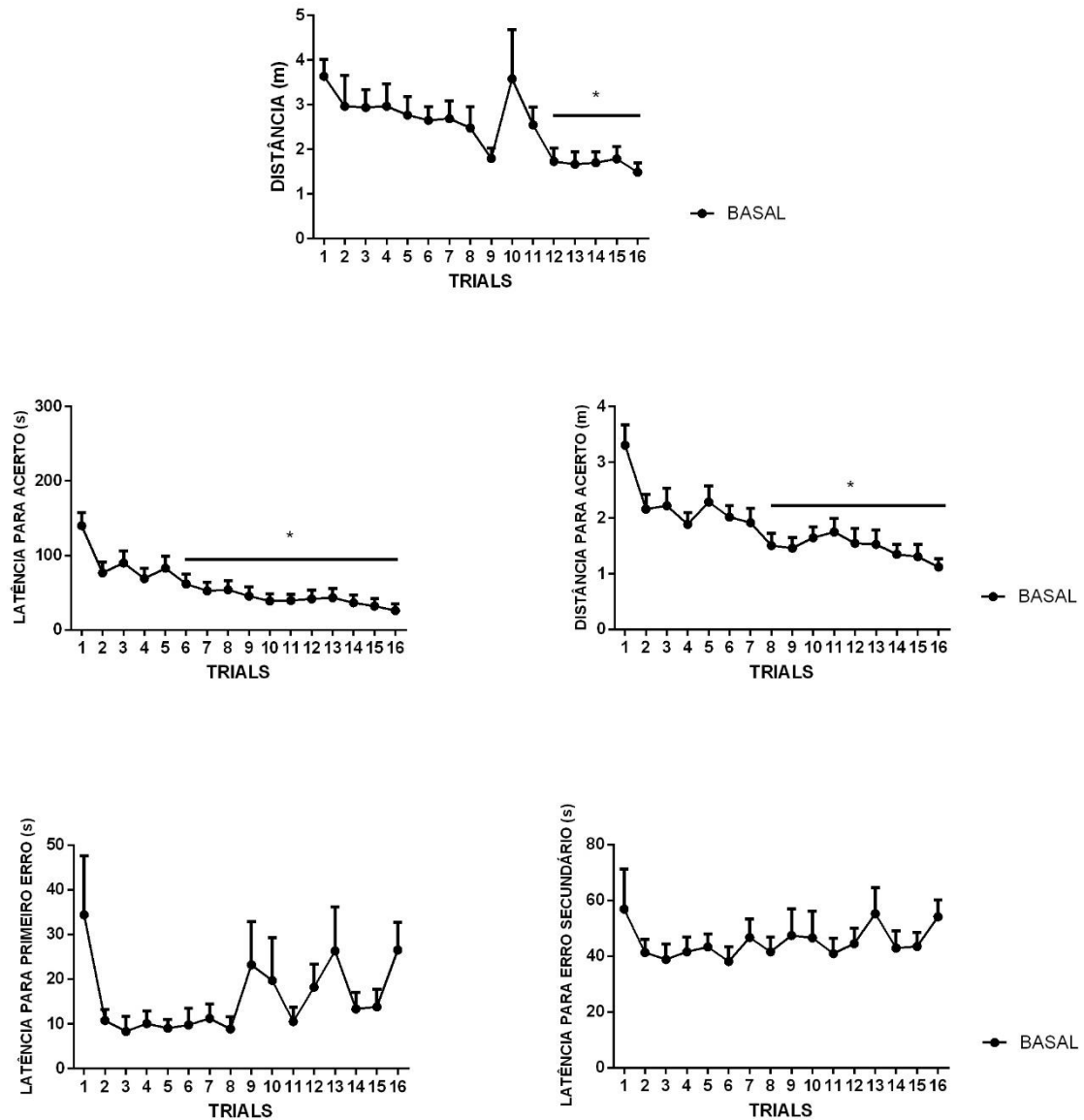


Figura 17: Parâmetros avaliados nos treinos do Barnes I, antes do tratamento. Houve diferenças estatísticas ao longo das sessões para os parâmetros distância, latência para acerto e distância para acerto (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, $*p < 0,05$, comparados ao primeiro trial). N total = 36.

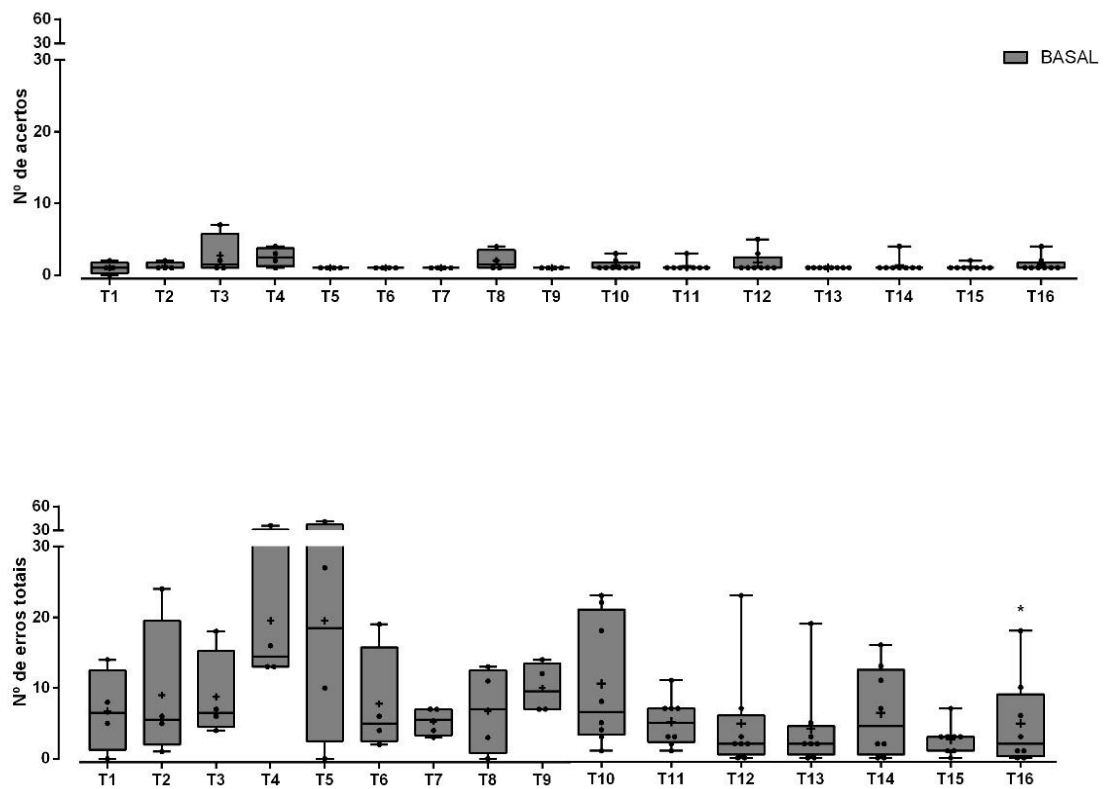


Figura 18: Parâmetros avaliados nos treinos do Barnes I, antes do tratamento. Houve diferenças ao longo dos *trials* em ambos os parâmetros (Friedman e Wilcoxon, $*p < 0,05$ comparado aos *trials* 1 e 2). N total = 36.

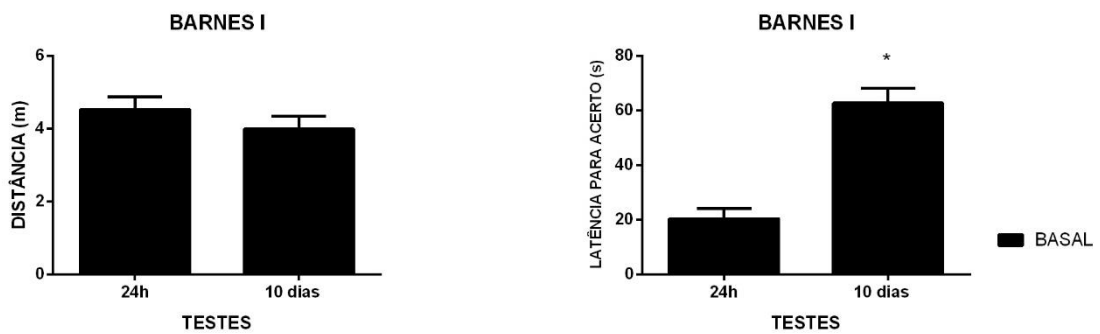


Figura 19: Parâmetros avaliados nos testes do Barnes I, antes do tratamento (teste T pareado, $*p < 0,05$ comparado ao teste 24h). N total = 36.

6.3.2.2 Barnes II

A ANOVA apontou que não houve efeito das exposições para os parâmetros de distância total percorrida ($F_{3,58, 53,73} = 2,28, p=0,079$), latência ($F_{4,18, 75,26} = 1,997, p=0,101$) nem latência para os erros primário ($F_{4,43, 79,76} = 0,648, p=0,232$) e secundário ($F_{4,8, 86,72} = 0,648, p=0,658$). Houve efeito da sessão para distância para acerto ($F_{4,2,1, 75, 85} = 2,738, p=0,032$), porém não foi possível identificar diferenças específicas entre os *trials* (Bonferroni, $p>0,05$) (figura 20).

Não pudemos revelar diferenças ao longo das sessões para o número de acertos ($X^2(15) = 16,48, p=0,350$), ou secundários ($X^2(15) = 13,90, p=0,535$); porém para o número de erros primários, vimos redução ao longo das sessões, com o último trial apresentando menor número que o primeiro trial ($X^2(15) = 29,53, p=0,011$; Wilcoxon, $T=9,5, p=0,004$) (dados não representados em figuras).

Não identificamos quaisquer diferenças entre os grupos em nenhum dos parâmetros para os testes 24h e 10 dias (ANOVA de uma via). Comparações entre os testes (24h e 10 dias) pelo teste T para amostras pareadas mostram diferenças apenas para o grupo salina no parâmetro de latência para o erro primário ($t_7 = -3,51, p=0,010$), bem como para a porcentagem de tempo no quadrante alvo ($t_6 = 4, 19, p=0,006$) (figura 21).

BARNES II

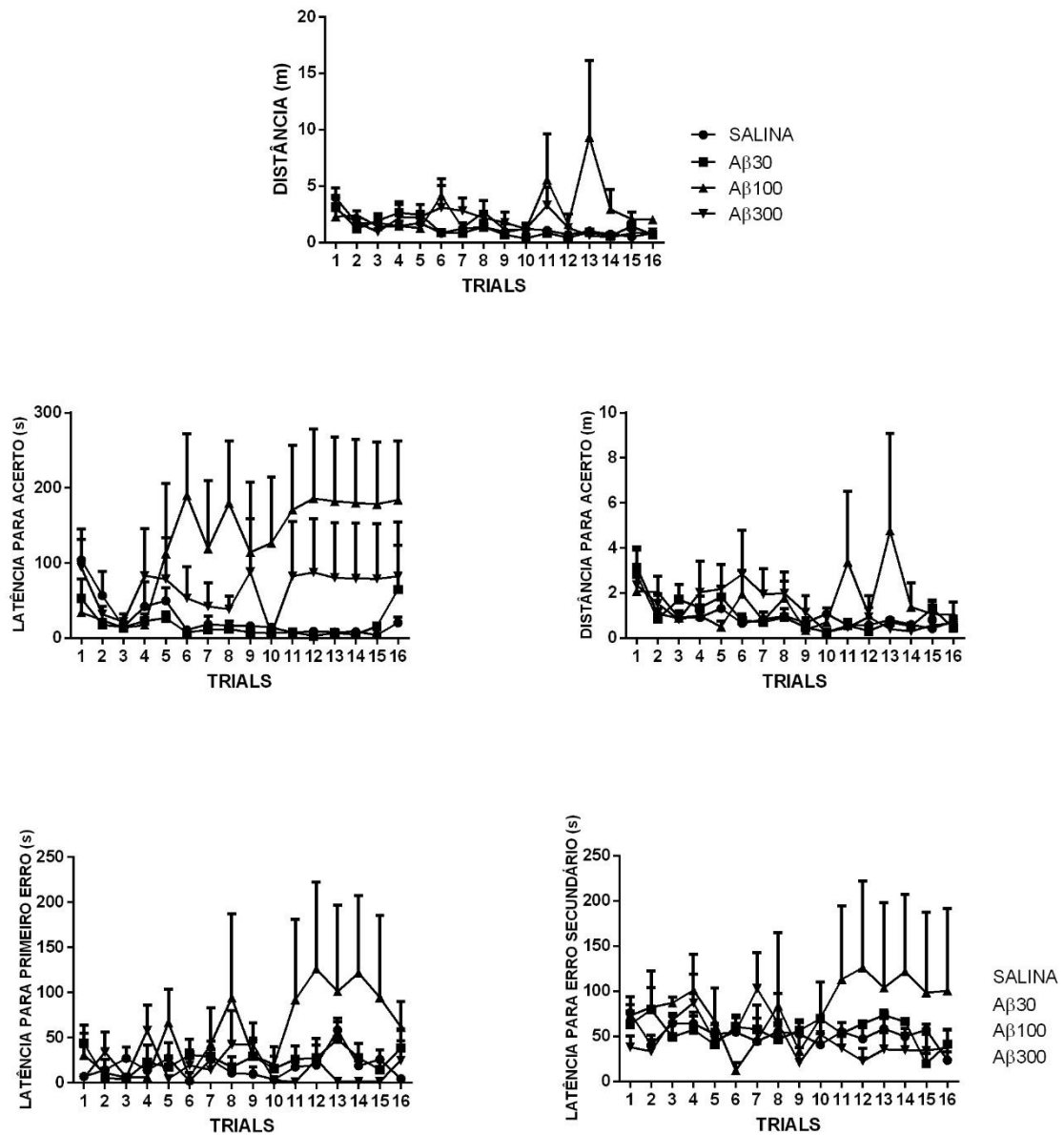


Figura 20: Parâmetros avaliados nos treinos do Barnes II de ratos submetidos à infusão repetida com A β (30, 100 ou 300 pmol) ou salina. Não houve diferenças estatísticas ao longo das sessões, como exceção da distância para acerto, e nem entre os grupos (ANOVA de medidas repetidas). N grupo salina = 8, N A β 30 = 5, N A β 100 = 4, A β 300 = 4.

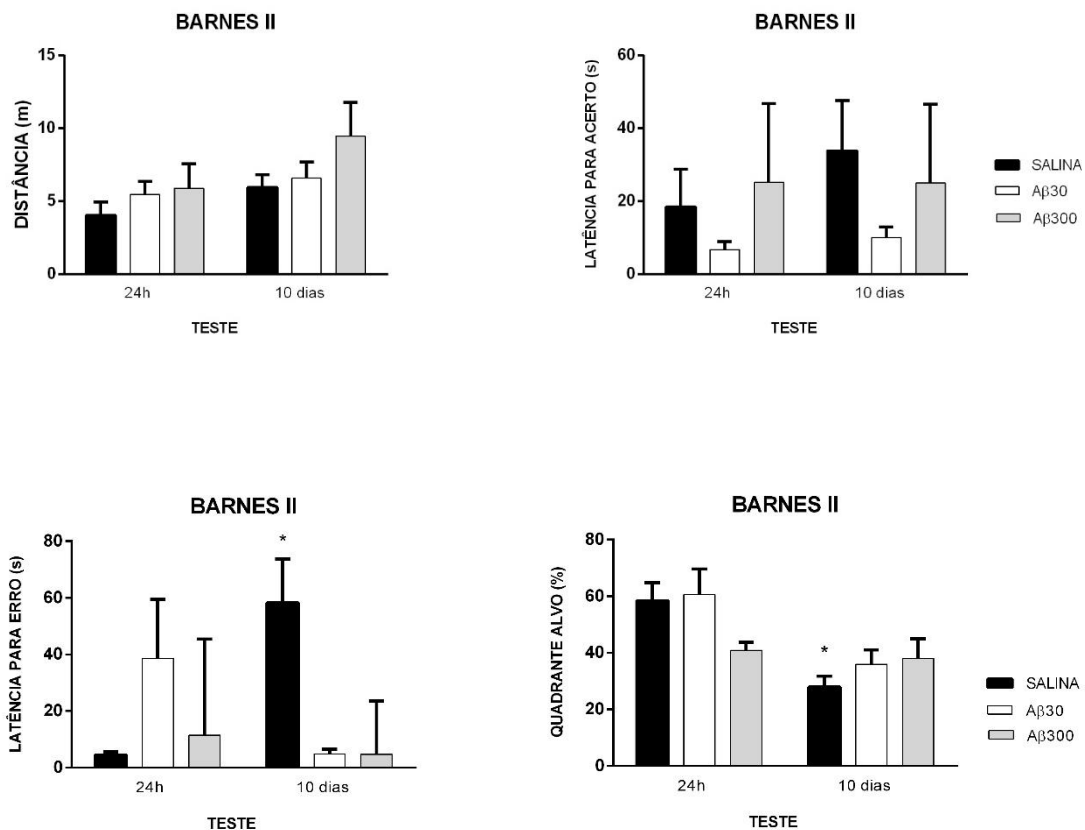


Figura 21: Parâmetros avaliados nos testes do Barnes II de ratos submetidos à infusão repetida com Aβ (30 ou 300 pmol) ou salina. Não houve diferença entre os grupos (ANOVA de uma via). Aqui o grupo Aβ 100 foi omitido, pois dos quatro animais ainda existentes nesse estágio do experimento, três apresentaram imobilidade para explorar o aparato, impedindo as análises dos parâmetros. N grupo salina = 8, N Aβ 30 = 5, N Aβ 100 = 4, Aβ 300 = 4. O grupo Aβ 100 foi retirado a partir dessas análises, pois devido à elevado imobilidade, três dos quatro animais não atingiram o alvo.

6.3.2.3 Barnes III

A ANOVA não mostrou efeito das exposições para o parâmetro de distância total percorrida ($F_{3,70,48,20} = 2,396$, $p=0,067$). A latência para acerto variou ao longo das sessões ($F_{3,23,42,04} = 2,765$, $p=0,050$), cujos *trials* finais diferem do primeiro (Bonferroni, $p<0,05$), sem efeito de grupo ou interação. Verificamos, ainda, diferenças ao longo das sessões para a distância para acerto ($F_{3,19,44,77} = 4,985$, $p=0,04$), com diferenças mostradas a partir do 6º trial em relação ao primeiro trial (Bonferroni, $p<0,05$). Não observamos diferenças quanto a latência para erros primário ($F_{1,50,21,13} = 1,048$, $p=0,349$) e secundário ($F_{6,70,93,79} = 1,399$, $p=0,217$) (figura 22).

Adicionalmente, não identificamos diferenças estatísticas para os números de acertos e erros entre sessões (Friedman) nem entre grupos (Kruskal-Wallis, dados não representados em figuras).

Não houve diferenças observadas entre os grupos para nenhum dos parâmetros analisados nos testes 24h ou 10 dias (figura 23).

Corroborando o resultado anterior para o Barnes II, análises entre os testes revelaram diferenças para o grupo salina no parâmetro de latência para o erro primário ($t_7 = -3,42$, $p=0,011$) e para porcentagem de tempo no quadrante alvo ($t_6 = 5,398$, $p=0,033$) indicando habituação ao aparato.

BARNES III

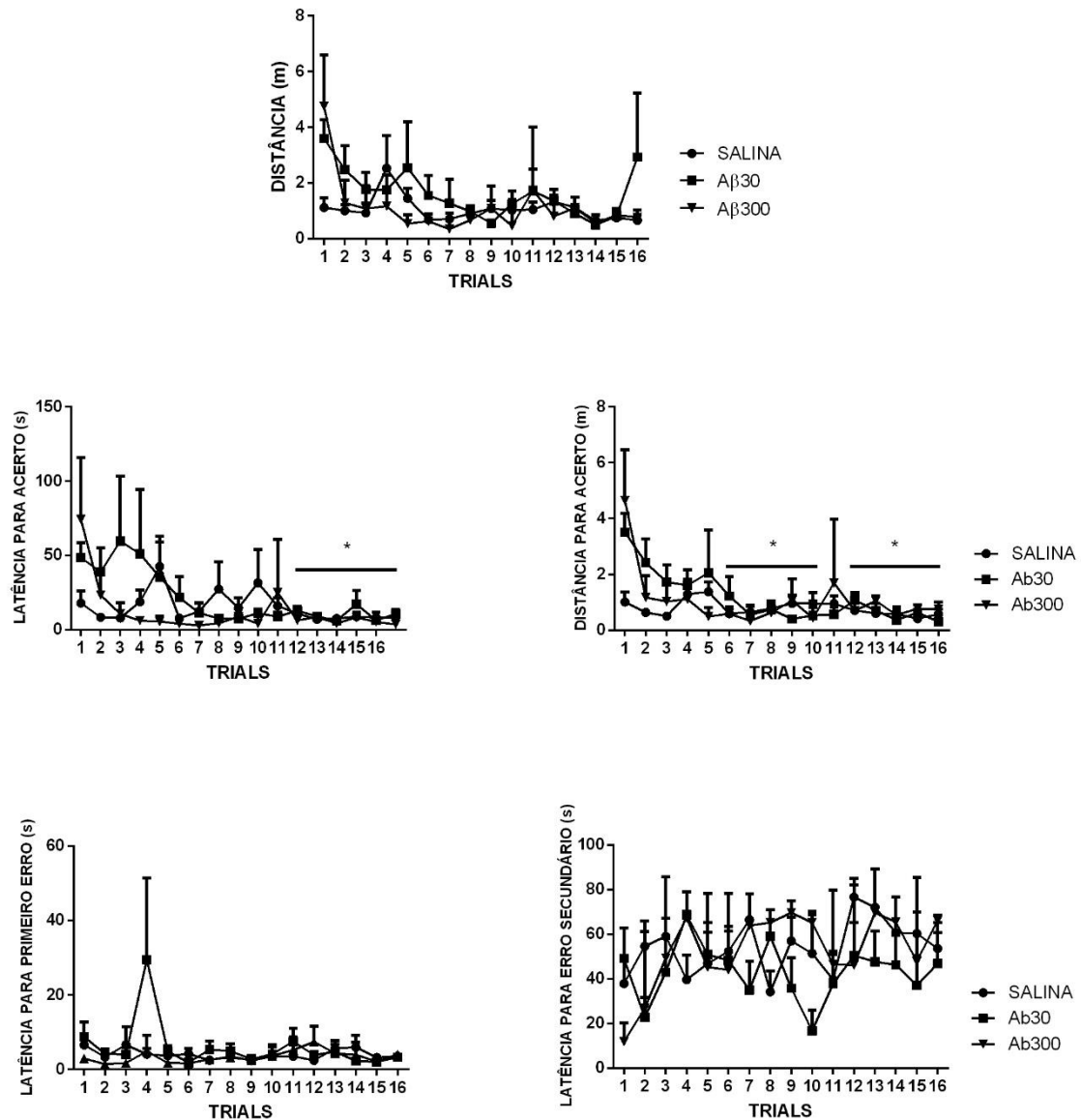


Figura 22: Parâmetros avaliados nos treinos do Barnes III de ratos submetidos à infusão repetida com Aβ (30 ou 300 pmol) ou salina. Houve diferenças estatísticas ao longo das sessões para latência e distância para o acerto (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, * $p < 0,05$ comparados ao trial 1). Aqui não foram mostrados os dados do grupo Aβ 100 pmol pelo fato de não haver número suficiente de animais no grupo nesse estágio do tratamento. N grupo salina = 8, N Aβ 30 = 6, N Aβ 100 = 1, Aβ 300 = 3.

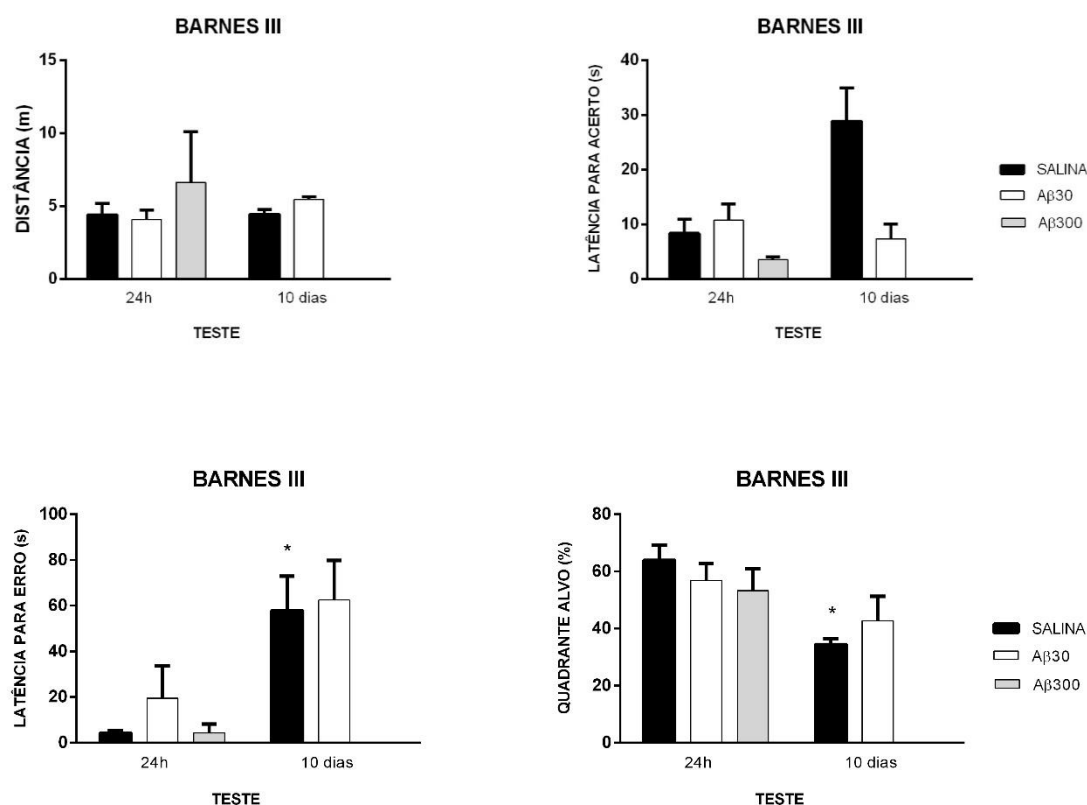


Figura 23: Parâmetros avaliados nos treinos do Barnes III de ratos submetidos à infusão repetida com Aβ (30 ou 300 pmol) ou salina. Não houve diferença entre os grupos (ANOVA) ou entre os testes (teste t pareado). Aqui não foram mostrados os dados do grupo Aβ 100 pmol pelo fato de não haver número suficiente de animais no grupo nesse estágio do tratamento. N grupo salina = 8, N Aβ 30 = 6, N Aβ 100 = 1, Aβ 300 = 3.

Ao fim dos experimentos comportamentais, os animais dos grupos salina e Aβ 30pmol foram eutanasiados e submetidos à imunohistoquímica para Aβ. Verificamos um aumento da marcação para os peptídeos Aβ no grupo tratado com 30pmol comparado ao controle no hipocampo ($t_7 = -3,525$, $p=0,010$) e no neocórtex ($t_7 = -6,033$, $p=0,001$) por meio da densidade óptica relativa (figura 24).

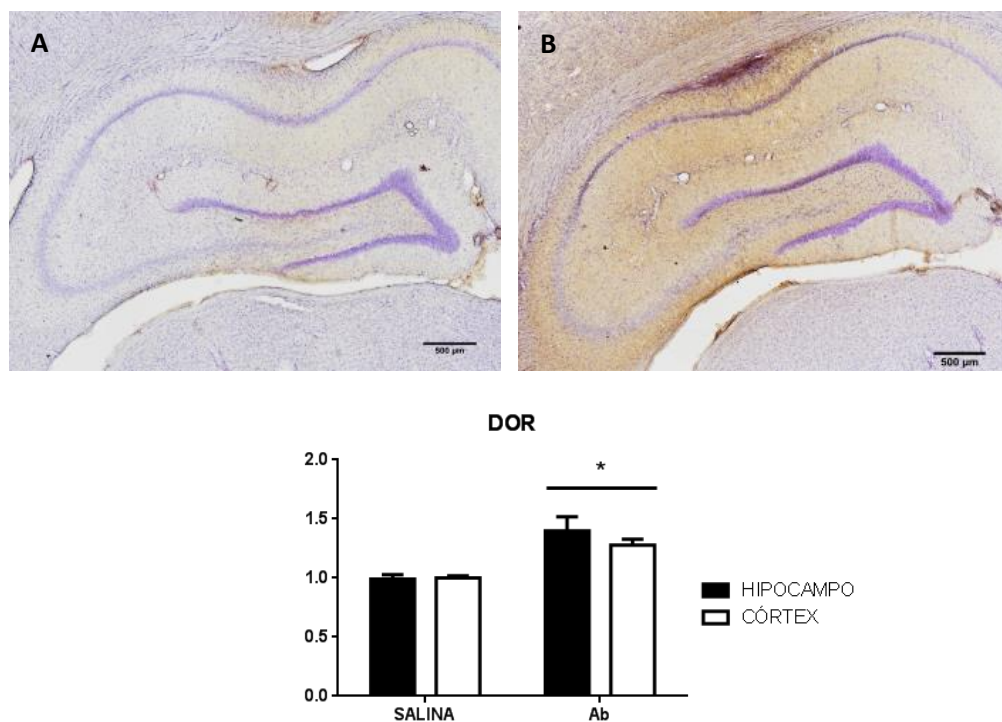


Figura 24: Imunohistoquímica para peptídeos A β . Imagens ilustrativas de um animal salina (A); e um animal A β (B). C, densitometria óptica relativa média dos grupos (teste T não-pareado, * $p < 0,05$). N salina = 4, N A β 30 = 4.

6.4 Experimento II

Efeitos da infusão intracerebral com A β 30 pmol sobre o desempenho geral e as estratégias de busca no labirinto de Barnes.

6.4.1 Materiais e métodos

Quatorze ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas guias nos mesmos sítios que no experimento anterior e divididos em dois grupos: salina e A β 30pmol. Iniciaram-se as infusões nesses animais e, a partir do 11º dia, os ratos foram submetidos a uma série de exposição ao Barnes, que contou com uma sessão de habituação, anterior à primeira sessão de treino, 4 treinos (2 *trials* por dia durante 4 dias) e um teste realizado 3 dias após o último trial. Essas modificações no

protocolo (diminuição do número de *trials* e aumento do intervalo entre a série de treinos e o teste) visaram impor maior dificuldade para execução da tarefa (figura 25). Nesse experimento avaliamos, além dos parâmetros habituais para o desempenho no Barnes, as estratégias de pesquisa do esconderijo na sessão de teste, conforme descrito previamente. Os animais foram submetidos à perfusão uma hora após a execução da sessão teste, porém devido a problemas técnicos na preservação do tecido, as análises imunohistoquímicas não puderam ser incluídas nesta tese.

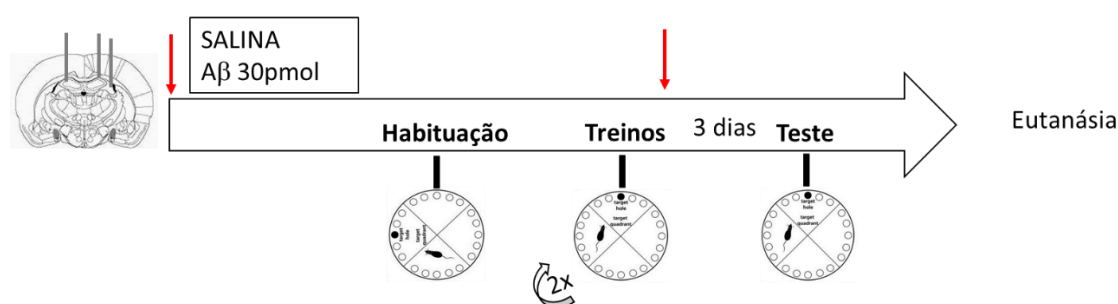


Figura 25: Delineamento do experimento II, capítulo III. Os animais foram submetidos a cirurgia para implante de cânulas CA1 bilateral e I.C.V. unilateral. As infusões foram realizadas por 15 dias, seguindo o protocolo anterior, e finalizaram após o último dia de treino. O início e o fim das infusões foram representados pelas setas vermelhas. As etapas da sequência do Barnes, habituação e treinos, foram efetivadas entre a 10 e a 15ª infusão, esta última dada após o último treino, seguindo o protocolo anterior. A seguir realizado teste 3 dias e perfusão 1 hora após o teste. Aqui o protocolo de execução do Barnes foi alterado para dois *trials* por dia, durante quatro dias, compondo quatro treinos e teste 3 dias após o último treino.

6.4.2 Resultados

Observamos por meio da ANOVA efeito das exposições para o parâmetro de distância total percorrida ($F_{7, 84} = 4,28$, $p < 0,001$), com redução ao longo dos *trials*, indicando que o trial final difere do trial 1 (Bonferroni, $p < 0,05$), sem efeito de grupo ou interação (figura 26).

A latência para acerto varia ao longo das sessões ($F_{2,98,35,83} = 10,39$, $p < 0,001$), com diferença entre os *trials* (4, 5-8) comparados ao trial inicial (Bonferroni, $p < 0,05$). Vimos diferenças ao longo das sessões também para a distância para acerto ($F_{7,84} = 6,80$, $p < 0,001$), indicando que trial 1 difere dos *trials* finais 6 a 8 (Bonferroni, $p < 0,05$) (figura 27).

Houve ainda efeito das sessões para porcentagem de tempo no quadrante alvo ($F_{3,61,43,40} = 11,41$, $p < 0,001$), indicando aumento desse parâmetro nos *trials* (4, 6 a 8) comparadas ao trial 1 (Bonferroni, $p < 0,05$). Não foram detectados efeitos dos *trials* para a latência para o primeiro erro ($F_{2,72,32,74} = 1,90$, $p = 0,153$), nem para latência para erro secundário ($F_{7,84} = 0,78$, $p = 0,598$). Não houve efeito da distância até primeiro erro ($F_{7,84} = 1,11$, $p = 0,363$) e até erro secundário ($F_{2,96,35,63} = 0,60$, $p = 0,602$) ao longo das sessões (figura 28).

O teste T para amostras independentes não revelou diferenças entre os grupos salina e A β , no teste realizado após 3 dias, para os parâmetros de distância percorrida ($t(4,8) = -1,17$, $p = 0,295$), velocidade ($t(12) = -1,55$, $p = 0,147$), latência para erro secundário ($t(11,89) = 0,578$), latência para primeiro erro ($t(12) = 0,717$, $p = 0,487$) e porcentagem no quadrante alvo ($t(12) = 0,734$, $p = 0,477$). No entanto, diferenças significativas entre os grupos foram verificados para os parâmetros de latência e distância para o acerto ($t(12) = -2,67$, $p = 0,020$, $r = 0,61$; $t(12) = -2,80$, $p = 0,016$; $r = 0,62$), os quais mostraram-se aumentados no grupo A β comparado ao salina. Tais significâncias foram reforçadas por tamanhos de efeito elevados para ambos parâmetros ($r > 0,50$) (figura 29).

Não houve diferenças entre os grupos para o número de acertos ($U = 19,50$, $p = 0,758$), número de erros primários ($U = 15,50$, $p = 0,384$) nem secundários ($U = 15,00$, $p = 0,345$), no teste 3 dias (dados não representados em figuras).

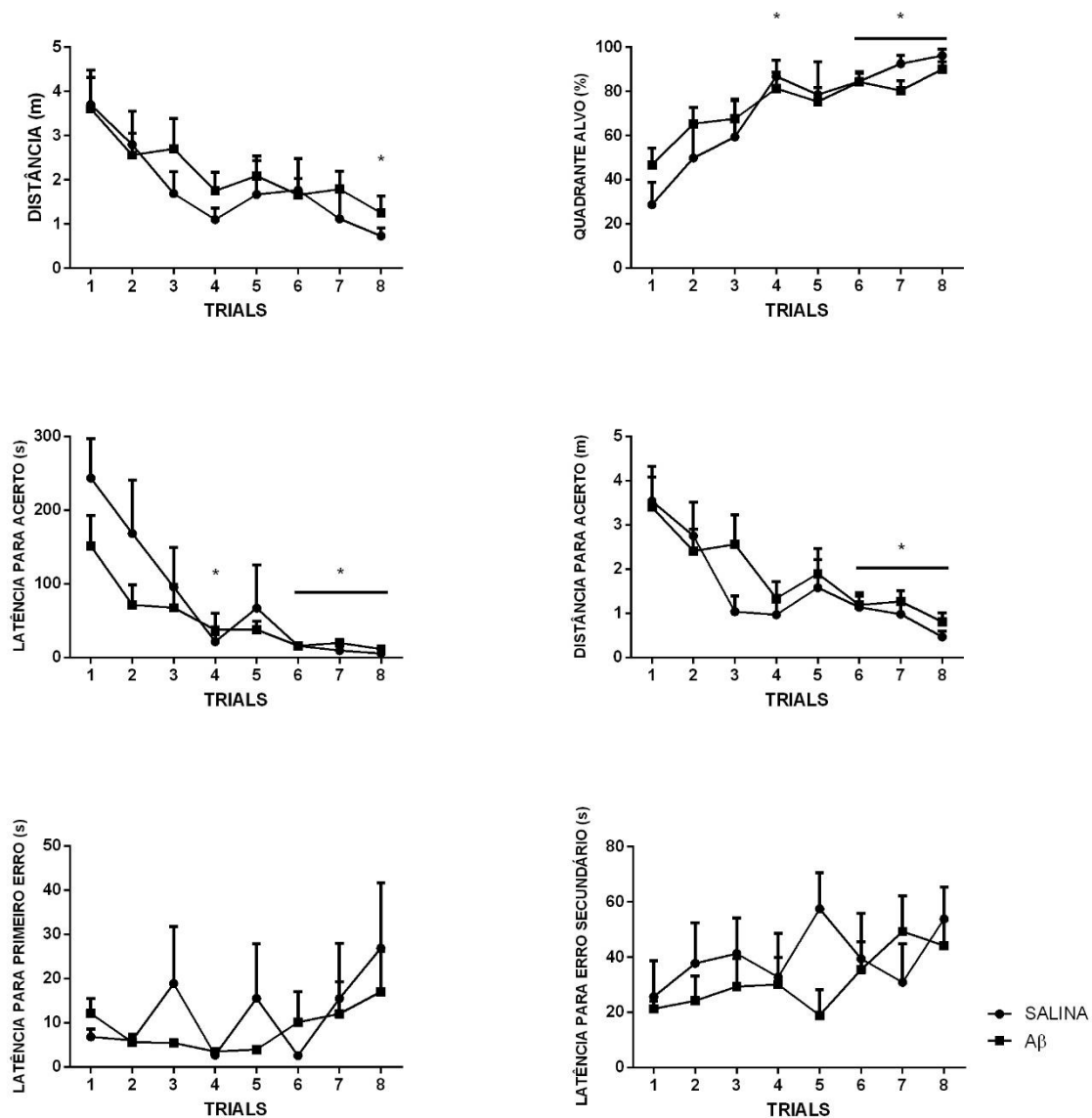


Figura 26: Parâmetros nos treinos do labirinto de Barnes (modificado para 2 *trials* por treino, 4 treinos) de animais que receberam infusões intracerebrais de salina ou Aβ 30pmol. Houve diferenças estatísticas ao longo das sessões para os parâmetros distância, latência para acerto e distância para acerto e porcentagem de tempo no quadrante alvo (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, * $p < 0,05$ comparados ao trial 1). N salina = 5, N Aβ 30 = 9.

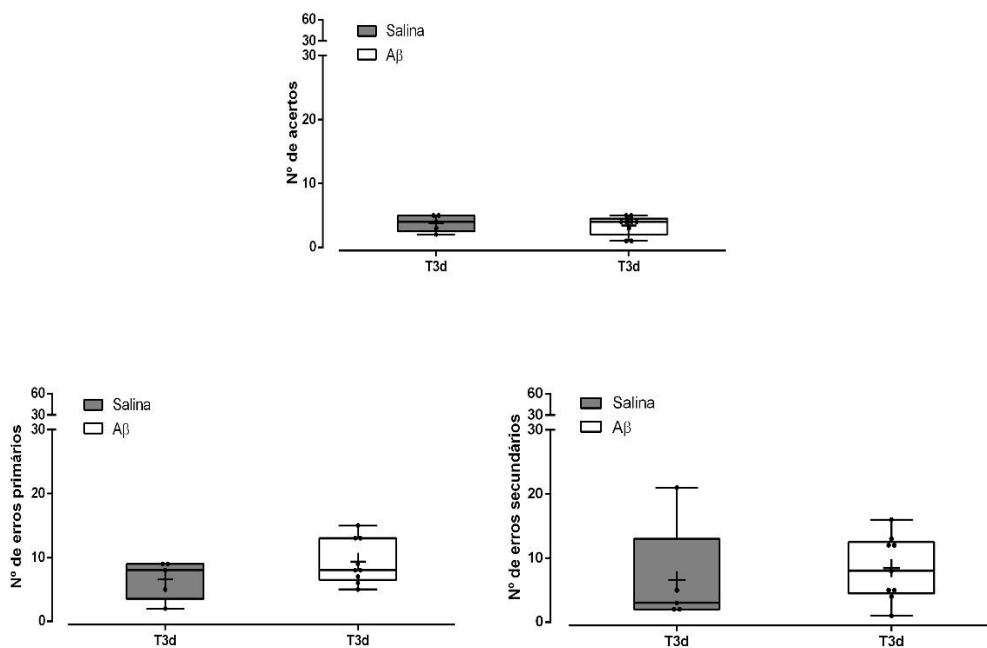


Figura 27: Parâmetros de números de acertos, erros primários e secundários para salina e A β , no teste 3 dias. Mann-Whitney, $p > 0,05$. N salina = 5, N A β 30 = 9.

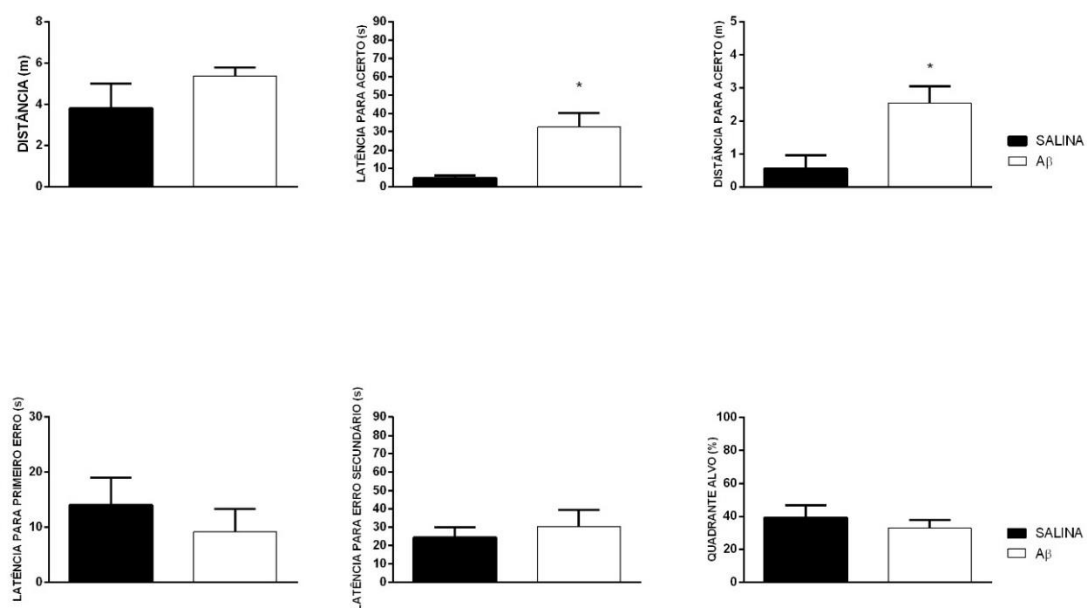


Figura 28: Parâmetros no teste do labirinto de Barnes (realizado com um intervalo de 3 dias dos treinos) de animais que receberam infusões intracerebrais de salina ou A β 30pmol. (Teste T pareado, * $p < 0,05$). N salina = 5, N A β 30 = 9.

A figura 29 mostra a análise das estratégias de busca utilizadas pelos animais. Encontramos efeito do tratamento para a estratégia usada para solucionar a tarefa (atingir o alvo) na sessão de teste (realizada 3 dias após o treino). O grupo salina preferiu a estratégia direta como primeira escolha para atingir o alvo comparado ao grupo A β (teste exato de Fisher, χ^2 (1) = 95.998, $p < 0.001$), e a probabilidade para essa escolha é de 32 vezes maior em ser efetuada pelo salina do que pelo A β (OR 32.36, 95% CI: 14.61 – 71.69). Considerando análises de estratégias para a sessão total de teste, o grupo A β usou em menor porcentagem a estratégia direta comparado ao salina, preferindo outros tipos de estratégias (teste exato de Fisher, χ^2 (1) = 20.276, $p < 0.001$; OR 5.091, 95% IC 2.456 – 10.553). Comparações das estratégias usadas na sessão total por cada grupo com o acaso (33,33%) mostraram que o grupo salina usou as estratégias similarmente (direta, $t_4 = -0.636$, $p = 0.559$; não-direta, $t_4 = 0.685$, $p = 0.531$), porém o grupo A β realizou menor porcentagem de estratégia direta que o acaso (direta, $t_8 = -3.020$, $p = 0.017$; não-direta, $t_8 = 3.121$, $p = 0.014$).

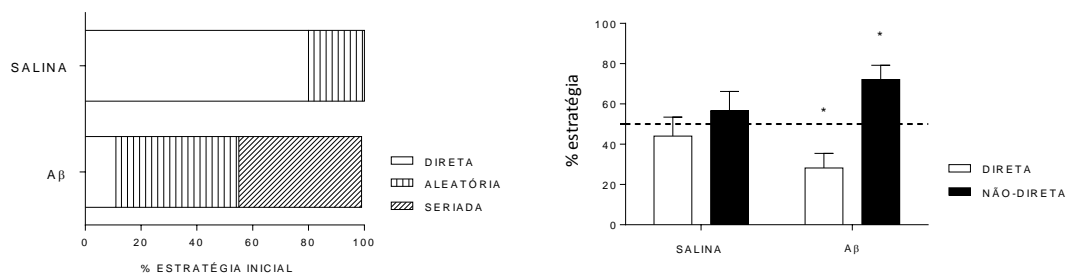


Figura 29: Análise de estratégias de busca no teste do labirinto de Barnes (realizado com um intervalo de 3 dias dos treinos) de animais que receberam infusões intracerebrais de salina ou A β 30pmol. Porcentagem de estratégia inicial (salina x A β , Fisher, χ^2 , $p < 0,05$). Porcentagem de estratégias ao longo da sessão por grupo, linha pontilhada representa a escolha ao acaso, estratégias direta e não-direta comparadas ao acaso (Teste T de uma amostra, $*p < 0,05$). N salina = 5, N A β 30 = 9.

6.4.3 Discussão

Nos experimentos deste capítulo, nós observamos o padrão similar de curvas de aprendizado ao longo dos *trials* para todos os grupos em comparação aos experimentos anteriores. Ainda, tal aprendizado evidenciado pelos parâmetros já mencionados de distância total, latência e distância para erros e acerto, para porcentagem de tempo no quadrante alvo e número de acertos e erros corroboraram o que é geralmente observado para o labirinto de Barnes (Barnes, 1979; Pompl et al., 1999; Sunyer et al. 2007). Entretanto, devido ao elevado número de comparações na análise entre os *trials*, o efeito das exposições geralmente detectado na ANOVA nem sempre foi confirmado pelas análises a posteriori de comparações entre *trials* específicos.

Não determinarmos diferenças significantes entre os grupos com a infusão de baixas doses (Nitta et al., 1994, Takeda et al. 2009) e elevada repetição de treinos (Attar et al. 2013) conduzindo a alterações de protocolo entre os experimentos. Além disso, a inexistência de diferenças entre grupos pode se dever a exposição inicial ao aparato anterior à infusão de A β , impedindo o efeito em aprendizado já efetivado. Reiserer et al. (2007) sugere que exposições repetidas levam ao aprendizado da regra, o que facilita um novo aprendizado em exposição seguinte. Ainda, podemos observar que houve uma alta variabilidade entre os animais, especialmente nos grupos tratados com as duas doses maiores. No experimento I, durante as infusões, os animais apresentaram elevado déficit motor e elevada taxa de mortalidade. Como ocorreu alguma mortalidade em todos os grupos (apesar de ser maior nas concentrações mais elevadas do tratamento), há a possibilidade de que o efeito seja independente da natureza do agente, por compressão mecânica do fluido injetado no tecido cerebral, por exemplo.

Nosso tratamento com peptídeos A β propiciou a sua incorporação no tecido cerebral como verificado com a imunohistoquímica e a densitometria óptica relativa, tendo o grupo A β apresentado maior expressão dos peptídeos, que o corrobora a infusão na direção da validade de constructo (Takeda et al. 2009). Entretanto nossa dose baixa de infusão, 30pmol, apesar de levar a incorporação dos peptídeos no tecido cerebral, não causou déficits pronunciados, como verificado em outros protocolos (Han et al., 2011; Tran et al., 2011; Cioanca et al., 2013). Porém, ainda com baixa dose, um déficit espacial sutil pôde ser confirmado (experimento 2). Nossos achados suportam outros que afirmam

que alterações neurotóxicas ocorrem antes mesmo da detecção dos sinais de déficits cognitivos (Foster, 2012; Braak & Braak, 1991a; Hardy & Selkoe, 2002; Desikan et al., 2012; Sperling et al., 2011; 2014).

Mostramos que animais que receberam A β 30 pmoL no experimento II apresentaram aumento da latência e distância para o acerto, no teste de 3 dias, ao contrário do que ocorreu no experimento I, no qual o teste foi realizado com 24 h de intervalo. Esse resultado indica que as mudanças de protocolo, reduzindo o número de *trials* por treino, e aumentando o intervalo de teste, permitiram a detecção de diferenças entre animais infundidos com A β 30 pmoL e o controle. Contudo, diferenças em outros parâmetros do teste 3 dias não foram observadas (número de erros e porcentagem de tempo no quadrante alvo), indicando que o grupo tratado apresentou alguma evocação. Entretanto, animais A β 30 mostraram preferência por estratégias do tipo não-diretas para encontrar a localização do esconderijo, corroborando o prejuízo na evocação espacial, a despeito do desempenho não ser completamente abolido. Por fim, a distância total no teste 3 dias não diferiu entre os grupos, indicando que os peptídeos não alteraram aspectos motores ou motivacionais.

Nossos dados do experimento II estão de acordo com estudos prévios que sugeriram os peptídeos amilóides como interferentes na conectividade hipocampal, necessária para navegação espacial e escolha de estratégia (Pouzet et al., 2002; Savonenko et al., 2005; O'Leary & Brown, 2009). Nesse estudo, as análises de estratégias para primeira escolha indicaram que o grupo salina preferiu a estratégia direta às demais, enquanto o grupo A β apresentou o padrão oposto. Tal resultado sugere que o déficit promovido pelo A β foi evidenciado pelo tipo de navegação escolhida, modificando o desempenho espacial comparado ao controle. Notadamente, quando os animais foram analisados pela média de porcentagem de estratégia adotada dentro do grupo, os animais A β mostraram preferência por estratégias não-diretas acima do acaso, enquanto os animais salina não mostraram diferenças entre as estratégias e o acaso. Apesar da aparente contradição, o resultado foi decorrente da aleatorização na procura pelo local seguro ao longo da sessão total de teste (Harrison et al., 2006). Em outras palavras, apesar de inicialmente preferirem a estratégia direta, no caso do grupo controle, os animais acabaram diversificando os tipos de busca ao longo da sessão de teste por não haver mais a presença do esconderijo.

O labirinto de Barnes tem sido usado em estudos de aprendizado espacial e memória em modelos transgênicos de Alzheimer (Pompl et al., 1999; Reiserer et al., 2007; O'Leary and Brown, 2009). Pompl, et al. (1999) sugeriram que animais transgênicos apresentaram dificuldade na execução da memória de referência espacial para atingir um lugar específico (Chapman et al., 1999; Chen et al., 2000; Janus, 2004). Esse resultado reproduz o déficit de memória encontrado em pacientes com Alzheimer (Kaskie & Storandt, 1995) devido ao prejuízo na função hipocampal (McNaughton et al., 1989; Poucet et al., 1991; McDonald & White, 1993). Rodriguez et al. (2013) demonstrou que camundondos expressando APOE4, um alelo de risco para o Alzheimer, apresentaram retardo no aprendizado e recordação na tarefa de Barnes. Eles também apresentaram redução no comprimento e densidade de espinhas dendríticas no córtex entorrinal medial, cujas alterações foram relacionadas ao prejuízo espacial precoce. Prut et al. (2007) mostraram que o modelo transgênico APP23 teve aumento na latência para atingir o alvo e no número de erros ao longo dos treinos no Barnes, além de deposição de placas no hipocampo e neocórtex. Além disso, esses animais expressaram retardo na troca da estratégia não-espacial para a espacial no curso dos treinos. No nosso estudo, não observamos alterações durante o treino do Barnes, provavelmente devido à natureza leve do déficit induzido em nosso protocolo. De fato, observamos diferenças com prejuízo espacial apenas na fase de evocação (teste 3 dias).

Em consonância com a dificuldade no uso de habilidades espaciais, Janus (2004) encontraram que o transgênico (TgCRND8) não usou estratégias espaciais no Morris, entretanto aprenderam a atingir o objetivo (alvo) usando estratégias não-espaciais. Hamm et al. (2017) também estudaram o modelo transgênico TgCRND8 e verificaram prejuízo na associação objeto e lugar em tarefa hipocampo-dependente. Em geral, estudos prévios sugeriram que o prejuízo no aprendizado e recordação da memória em modelos de Alzheimer são devido a déficits no uso de estratégias espaciais promovidas pelo acúmulo ou aumento na produção de peptídeos A β . De maneira complementar, nossos resultados mostraram alterações sutis no desempenho espacial e no uso preferencial de outras estratégias não classificadas como direta, em decorrência da infusão de peptídeos A β , sugerindo similaridade com estágios precoces da doença de Alzheimer.

Versões de labirintos espaciais usados em estudos com humanos em ambientes virtuais avaliam também a detecção de déficits de memória induzidos por dano hipocampal (Skelton et al., 2000; Moffat et al., 2001; Astur et al., 2002; Bohbot et al.,

2004; Bartsch et al., 2010; Goodrich-Hunsaker et al., 2010; Kumaran et al., 2007). Tais investigações na navegação espacial em humanos poderiam permitir a detecção precoce da demência para intervenções terapêuticas no curso inicial da doença, aumentando a eficácia do tratamento.

Da mesma forma que em roedores, a exposição contínua a tarefas diminui a possibilidade de detecção do prejuízo (Jansen et al., 2010). Por outro lado, a demora na execução da implementação da recordação também favorece a detecção do déficit memória episódica (Albert, 1997; Foster, 1999). A respeito disso, contrário aos resultados descritos no nosso estudo, Hamm et al. (2017) não verificaram prejuízo no desempenho do Barnes. Tais achados contraditórios possivelmente se devem à redução do número de *trials* de treino e aumento do intervalo entre treino e teste no nosso estudo, comparado ao estudo de Hamm et al. (2017). Essas discrepâncias também foram verificadas no presente trabalho entre os experimentos, mostrando que aqueles onde os animais foram expostos a maior número de *trials* e com testes realizados 24h após os treinos, não puderam relevar diferenças entre os tratados com A β e seus controles.

Nossos dados corroboraram estudos que sugeriram que alterações iniciais podiam estar relacionadas com a neurotoxicidade de A β , prejudicando a evocação espacial e, portanto, deviam afetar mecanismos moleculares/bioquímicos. Nesse sentido, mais estudos precisam ser realizados. Achados anteriores evidenciaram a atividade sináptica de vários receptores glutamatérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, adrenérgicos e gama-aminobutíricos sendo moduladas pela indução de A β (Cheng et al., 2014; Dickey et al., 2004). A ativação de genes imediatos pode ser epigeneticamente regulada por APP (proteína precursora amiloide), cuja expressão basal já se apresenta elevada em detrimento da indução gênica após a exposição ao meio (Hendrickx et al., 2014). Corbett e cols. (2017) encontraram que camundongos transgênicos para APP tiveram redução na expressão de c-Fos no giro denteado após ativação por crise epilética. Assim, a desregulação na expressão de genes imediatos induzida por peptídeos A β pôde promover mecanismos apoptóticos e inflamatórios precedendo a degeneração sináptica e a morte neuronal (Smeyne et al., 1993; Anderson et al., 1994; 1995; Dickey, et al. 2003; 2004; LeBlanc et al., 2014; Ramcharitar et al., 2013). Em nosso experimento II, os animais foram eutanasiados uma hora após a realização do teste 3 dias e submetidos a imunohistoquímica para genes imediatos (c-Fos e Zif-268) para verificar a influência de A β sobre a expressão gênica e, por consequência sobre os processos de ativação neuronal

e consolidação, entretanto devido aos problemas técnicos que ocorreram na preservação do tecido, desconsideramos esses resultados. Sendo assim, estudos futuros realizando a análise de genes imediatos em protocolo semelhante ao aqui empregado podem fornecer evidências para a relação entre A β , déficits de memória espacial e ativação de genes imediatos.

Palop e cols. (2005) relataram déficits de aprendizado em camundongos transgênicos para hAPP, mesmo sem identificação da formação de placas. Eles concluíram que a redução na atividade neuronal contribuiu para déficits no modelo. Essa redução na ativação neuronal tem sido verificada em humanos com a doença (Christensen et al., 2013; Reisberg, 2006). Hamm et al. (2017) verificaram que camundongos transgênicos (TgCRND8) apresentaram mudanças nas redes inibitórias hipocampais decrescendo a expressão de c-Fos em CA1. Assim, peptídeos A β poderiam interferir com atividade em CA1 mesmo em baixas quantidades, conduzindo a alterações nas redes inibitórias e transmissão sináptica (Funato et al., 1998). Em adição, enquanto há evidência de vulnerabilidade dos neurônios CA1 em estágios precoces da doença (Counts et al., 2014), o giro denteado exibe resistência a alterações induzidas por A β (Braak, et al. 1992; West, et al. 1994; Thal, et al. 2002). De fato, alterações precoces também demonstram o envolvimento do córtex entorrinal (Braak, et al. 1992; West, et al. 1994; Gomez-Isla, et al. 1996). Os peptídeos A β desencadeiam modificações no circuito responsável pela memória espacial, no caso do nosso estudo, verificamos um leve déficit espacial e modificações na pesquisa de estratégias da tarefa. Caso o tratamento com peptídeos A β fosse mais prolongado ou com doses superiores àquela utilizada poderíamos verificar déficits mais pronunciados ou a total inabilidade na realização da tarefa. Realizamos tais tratamentos no experimento I, mas os mesmos permanecem por serem investigados com as alterações de protocolo na exposição ao labirinto do último experimento.

A etiologia do Alzheimer ainda é desconhecida, contudo um grande número de evidências apoiando a associação dos peptídeos A β como fatores contribuintes para disfunções neuronais e déficits cognitivos (Braak & Braak, 1991a); Palop et al., 2003; Dickey et al., 2003; 2004; Eustache et al., 2004; Sadek et al., 2004). O protocolo de infusão de A β usado aqui induziu um sutil déficit cognitivo no desempenho da tarefa, aproximando-o dos achados iniciais navegacionais no Alzheimer, pré-clínicos ou sintomáticos (Henderson et al. 1989; Ishii et al., 2005; Bohbot et al., 2007; Cushman et al., 2008). A detecção de mudanças cognitivas sutis sob a infusão de A β em baixa dose

(30pmoL) é mais apropriado para investigação dos mecanismos moleculares e potenciais neuroprotetores, pois aumentam a eficácia de intervenções no sentido de barrar a doença. Além disso, animais tratados com A β apresentaram alguma expressão na evocação da memória, porém utilizando estratégias distintas daquelas efetuadas na condição fisiológica não alterada. Nossos dados de alterações sutis na memória espacial induzidas por A β , aproximam-se da manifestação inicial do Alzheimer, indicando que os déficits já existem e protocolos adequados são capazes de detectá-los, no caso, a forma de navegação no aparato espacial por meio da investigação de estratégias. Assim, nosso trabalho se torna relevante para investigações mecanicísticas e terapêuticas em estágios precoces ou pré-clínicos.

7. Capítulo IV

Efeitos do extrato hidroalcóolico de *Erythrina velutina* sobre o desempenho de animais infundidos com peptídeos A β no labirinto de Barnes

7.1 Introdução

Erythrina é um gênero composto por plantas da família *Fabaceae*. *Erythrina velutina* é popularmente conhecida como “mulungu”, tem ocorrência endêmica ao longo da costa norte e nordeste do Brasil, e seu extrato de folhas ou casca apresenta propriedades sedativas e calmantes, utilizadas pela medicina popular (Dantas, et al. 2004; Santos, et al. 2012a; Teske & Trentini, 1995; Matos, 1997). Estudos fitoquímicos revelam a presença dos flavonóides, alcalóides (McKee, et al. 1997; Garcia-Mateos, et al. 1981; Kòbaiashi, et al. 1997; Telikepalli, et al. 1990; Hegde, et al. 1997), fenóis, taninas, antocianinas, xantonas, esteróides, triterpenos, saponinas e cumarinas, no extrato aquoso das folhas de *E. velutina* (Matos, 1997). O gênero *Erythrina* é muito rico em metabólitos secundários da classe flavonóide (Majinda et al., 2005). Porém, o componente de maior atividade biológica presente no mulungu são os alcalóides (Ozawa et al. 2009).

Flavonóides podem afetar funções celulares agindo sobre fatores como prostaglandinas, TNF e COX, atuando como anti-inflamatórios (Middleton et al., 2000; Talhouk et al., 2007). Exibem ainda, propriedades antioxidantes sobre espécies reativas de oxigênio, prevenindo os efeitos deletérios do estresse oxidativo em doenças e no avanço da idade (Gutteridge, 1993, Hartman et al. 2006). Estudos mostram que flavonóides afetam a memória e cognição promovendo o fluxo sanguíneo cerebrovascular e atuando contra a neurodegeneração (Spencer, 2009), em modelos animais de prejuízo cognitivo da idade avançada (Ramirez & Izquierdo, 2005; Joseph et al. 1999, Casadesus et al. 2009).

Estudos anteriores apoiam os efeitos ansiolíticos da *E. velutina* (Ribeiro, et al. 2006; Onusic, et al. 2002; Onusic, et al. 2003; Dantas, et al. 2004; Marchioro, et al. 2005) e, em baixas doses, amnésicos (Dantas et al. 2004; Raupp, et al. 2008), indicando a

separação entre efeitos ansiolíticos e amnésicos dependendo da dose, além de sugerir que o aumento da dose eleva algum constituinte que exerce ação antiamnésica (Raupp, et al. 2008). A inibição de acetilcolinesterase e de butirilcolinesterase foi avaliada em cérebros de camundongos, *in vitro* e *ex vivo*, com a administração dos extratos aquoso e alcalóide de *E. velutina* (Santos, et al. 2012a). Uma redução na atividade colinérgica é associada à disfunção cognitiva em doenças como o Alzheimer (Cohen-Salmon et al. 1997, Cohen & Eichenbaum, 1993). A hipótese colinérgica foi a primeira proposta para explicar a cauda da doença, sendo baseada nos fatos de que o curso da doença evidencia redução da acetilcolina (Davies & Maloney, 1976; Bowen et al. 1976; Bowen et al. 1977), bem como a redução no número de neurônios colinérgicos, cuja maior concentração se origina no núcleo basal de Meynert (Whitehouse et al. 1981). A perda de inervação colinérgica foi associada à deposição de placas neuríticas (Struble et al. 1982). Embora existam outras hipóteses que tentam explicar a patologia, como a hipótese da cascata amilóide (Hardy & Allsop, 1991) e outras disfunções de neurotransmissores (Cheng et al., 2014; Dickey et al., 2004), os medicamentos mais efetivos no retardo da progressão são os inibidores da colinesterase (Mori et al. 2006).

Alcalóides naturais são considerados potenciais para ação anticolinesterásica, no intuito de identificar outros agentes terapêuticos para o Alzheimer, como ocorreu com outros fármacos usados atualmente e de constituição alcalóide, rivastigmina, fisostigmina e galantamina (Ballard, et al. 2011). Nesse sentido, a huperzina A tem sido mostrada como agente promissor em estudos anteriores (Zhang et al. 2006). É crescente, portanto o interesse na identificação e isolamento de compostos de constituição alcalóide para o desenvolvimento de novos inibidores da colinesterase (Konrath et al., 2013).

Corroborando esse fato, o uso dos extratos de *E. velutina* poderia ser um aliado na terapêutica da demência (Santos, et al. 2012a). Além disso, estudos prévios mostrando efeitos sedativos e ansiolíticos de extratos das folhas de *E. velutina* (Ribeiro, et al. 2006; Onusic, et al. 2002; Onusic, et al. 2003; Dantas, et al. 2004; Marchioro, et al. 2005) reforçam ainda mais seu uso como terapêutica para o Alzheimer, já que a agitação e a ansiedade estão entre as comorbidades presentes (Mega, et al. 1996), melhorando a qualidade de vida geral (Santos, et al. 2012a).

Estudo recente mostrou atividade antiinflamatória e anticoagulantes de inibidor da família Kunitz de sementes de *E. velutina*, em modelos de sepse peritonial (Machado, et al. 2013). Os inibidores do tipo-Kunitz são bem caracterizados como bloqueadores de

serina-peptidases envolvidas, por exemplo, em inflamação (González-gonzález, et al. 2003; Fan & Wu, 2005; Santos, et al. 2012b), corroborando o uso de *E. velutina* no Alzheimer (McGeer, et al. 2006; Sastre et al., 2011).

Os alcalóides também possuem potentes propriedades antioxidantes, contribuindo com o efeito neuroprotetor sobre o estresse oxidativo, o qual constitui-se em um evento precoce no curso da doença (Konrath et al., 2013). Além de deslocar a cascata amilóide para via não-amiloidogênica (Jung, et al. 2009), promovendo a inibição das enzimas β - e γ -secretases (Lleo et al., 2006; Mangialasche et al., 2010). Apoiando esses achados, a *E. velutina* tem se mostrado um potencial agente terapêutico, haja vista sua composição e mecanismos de ação sugeridos em trabalhos anteriores, mostrando ação antiamnéstica e inibição sobre as colinesterases (Raupp, et al. 2008; Santos, et al. 2012a; Carvalho, et al. 2009).

Apesar dessas indicações de potencial efeito benéfico em doenças neurodegenerativas em geral, e em específico na Doença de Alzheimer, os efeitos da *Erythrina velutina* vem sendo pouco explorados na literatura. Ainda, o estudo de potenciais tratamentos neuroprotetores em doenças neurodegenerativas idealmente deve ser realizado por meio de protocolos que permitam a investigação de etapas iniciais da doença, bem como sua progressão, dado que sua efetividade está intimamente relacionada à precocidade. Nesse sentido, nosso estudo propõe a investigação dos efeitos comportamentais para avaliar o potencial terapêutico do composto sobre o desempenho de animais infundidos cronicamente com A β e testados em uma tarefa espacial, usando o labirinto de Barnes.

7.2 Objetivo

Verificar os efeitos do extrato hidroalcoólico de *E. velutina* no desempenho de ratos tratados com A β no labirinto de Barnes.

7.3 Materiais e métodos

Trinta e dois ratos machos Wistar foram divididos em 4 grupos, que receberam oralmente salina ou 200mg/kg de mulungu e, salina ou A β 30pmol, intracerebralmente, compondo os grupos: sal/sal, sal/A β , mul/sal e mul/A β . O mulungu (200mg/kg) ou a salina foram administrados oralmente (gavagem) 8 dias antes do início das infusões de A β e o tratamento persistiu todos os dias até o fim dos experimentos, compondo 40 dias de administração de mulungu e avaliações ao longo do tempo. A infusão de beta-amiloide aconteceu por 15 dias: no primeiro dia 0,5microL de A β ou sal bilateralmente em CA1 bilateral e no ventrículo lateral, e a partir do 2º dia até 15º, a infusão é diária no ventrículo, como descrito anteriormente. Nesse experimento, devido à alta mortalidade verificada no experimento anterior, realizamos apenas a dose de 30pmol. São realizadas 2 sequências de Barnes, a primeira, assim como no experimento anterior foi feita a partir do 11º ao 15º dia de infusão e a segunda sequência, 10 dias depois. Na primeira sequência, os animais passaram por uma habituação no dia anterior à série de treinos. Os animais foram submetidos a uma série de dois *trials* por dia, durante quatro dias e, para cada sequência foram realizados teste 24h e reteste 3 dias, adicionalmente apenas a primeira sequência contou com reteste 10 dias (figura 30).

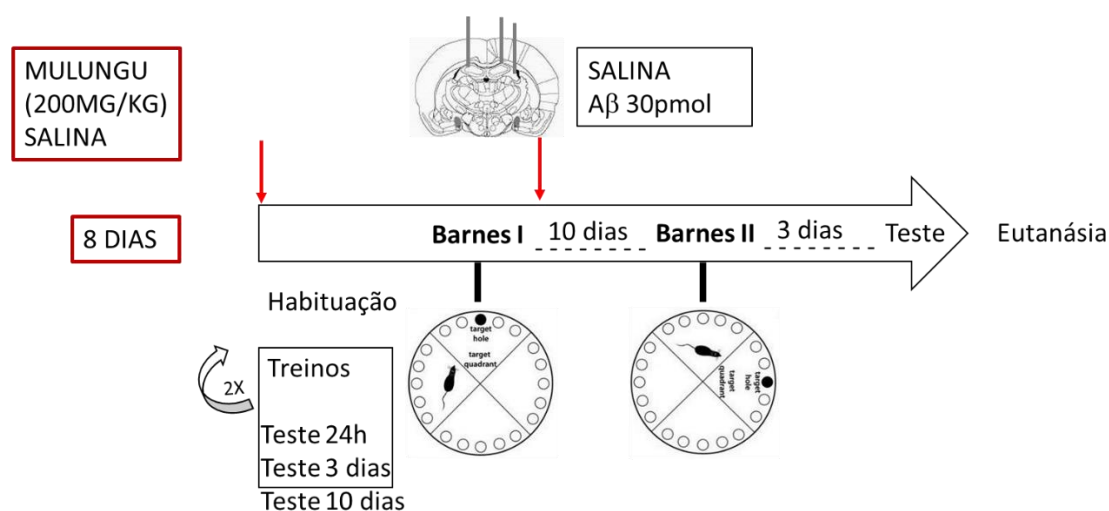


Figura 30: Delineamento experimental do capítulo IV. Os animais foram submetidos a gavagem de mulungu 200mg/kg ou salina por todo o procedimento comportamental, iniciando 8 dias antes do início das infusões. As infusões de salina ou A β 30 pmol foram realizadas por 15 dias (CA1 bilateral e I.C.V. unilateral); o início e o fim das infusões

foram representadas por setas vermelhas. Dessa forma, os animais foram divididos em quatro grupos: salina, salina/A β , mulungu/salina, mulungu/A β , submetidos a duas sequências de Barnes, a primeira coincide com as 11ª e 15ª infusões. O procedimento do Barnes compreende dois *trials* por dia, durante quatro dias (treinos), teste 24h, teste 3 e/ou 10 dias. Ao final da segunda sequência, os animais foram eutanasiados.

7.4 Resultados

7.4.1 Barnes I

A ANOVA mostrou efeito das exposições para o parâmetro de distância total percorrida ($F_{7,196} = 9,91$, $p < 0,001$), a qual diminuiu ao longo dos *trials*, mas sem interação ($F_{21,196} = 0,973$, $p = 0,499$) e sem efeito de grupo ($F_{3,28} = 2,491$, $p = 0,081$). O mesmo perfil de efeitos ocorreu para a porcentagem de tempo no quadrante alvo (efeito de sessões - $F_{4,83,135,31} = 23,794$, $p < 0,001$), a qual aumentou ao longo dos *trials*. Para ambos, o primeiro trial difere dos demais (Bonferroni, $p < 0,05$) (figura 31).

Houve efeito das sessões para a latência ao acerto ($F_{7,196} = 28,580$, $p < 0,001$), indicando que redução do trial 1 aos demais (Bonferroni, $p < 0,05$), sem efeito de grupo ($F_{3,28} = 0,261$, $p = 0,131$) ou interação ($F_{21,196} = 0,980$, $p = 0,480$). Vimos ainda efeito da distância ao acerto ao longo dos *trials*, sendo que o trial 1 difere dos demais ($F_{7,196} = 11,490$, $p < 0,001$; Bonferroni, $p < 0,05$). Houve efeito das sessões para a latência para o primeiro erro ($F_{1,12,31,61} = 6,28$, $p = 0,015$; Bonferroni, $p < 0,05$), mas não foi observado para latência para o erro secundário ($F_{7,196} = 1,225$, $p = 0,291$) (figura 31).

Não foram observadas diferenças entre os grupos para nenhum dos parâmetros analisados (distância total, latência/distância ao acerto, latência/distância para erros primário e secundário ou porcentagem de tempo no quadrante alvo) em nenhum dos testes efetuados (24h, 3 dias e 10 dias ANOVA de uma via). Avaliando-se a latência para acerto entre os testes também não foram observadas diferenças ($F_{1,8} = 1,850$, $p = 0,219$) (figura 32).

BARNES I

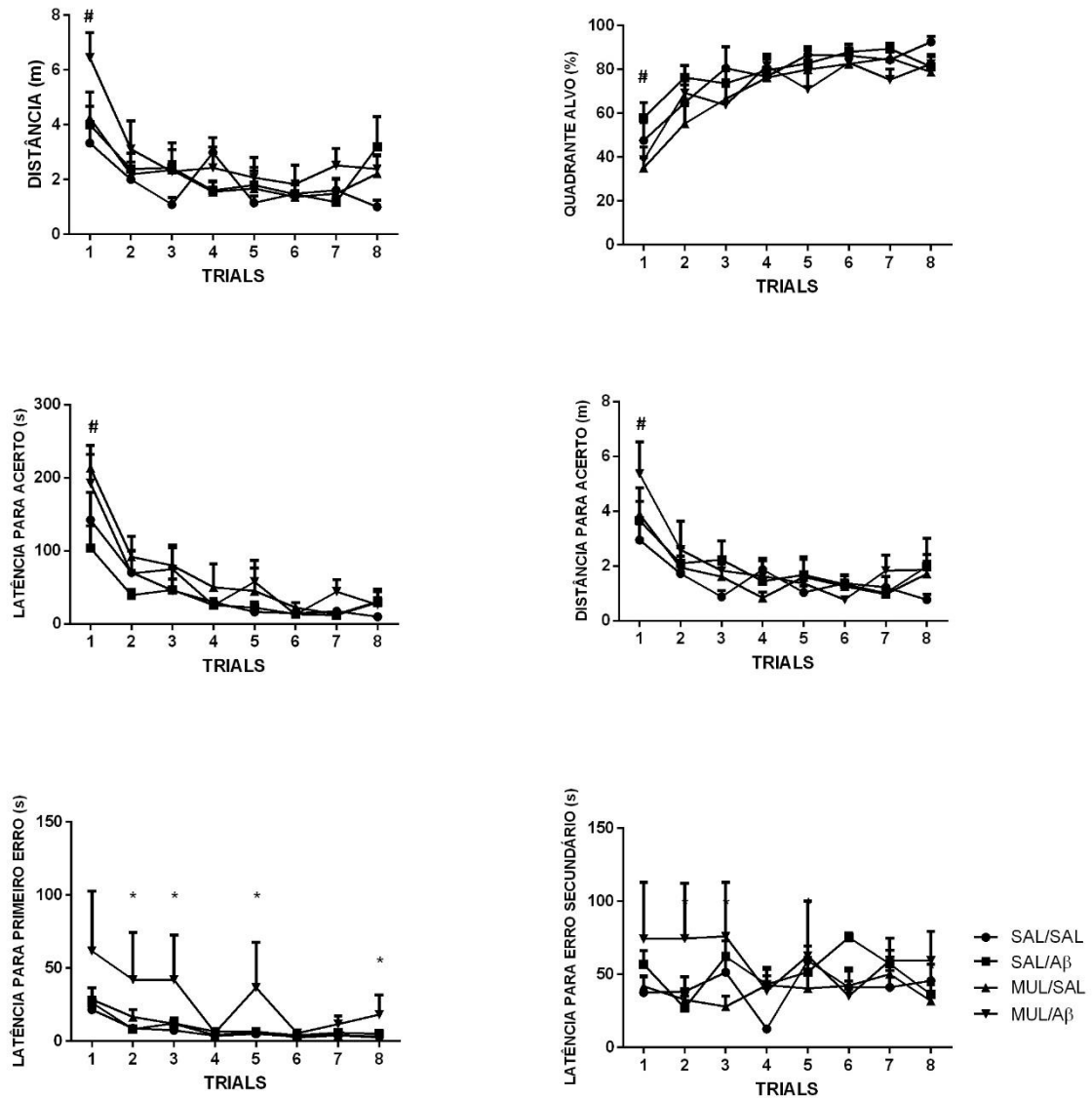


Figura 31: Parâmetros avaliados por trial no Barnes I de animais tratados com infusão intracerebral de salina (SAL) ou A β 30 pmol, concomitantemente ao tratamento por via oral com SAL ou 200 mg/kg de mulungu (MUL). Houve diferenças estatísticas ao longo das sessões para todos os parâmetros, exceto para a latência para o erro secundário (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, # $p < 0,05$ comparado aos demais *trials*, * $p < 0,05$ comparado ao trial 1). Não houve efeito do grupo. N = 8, em cada grupo.

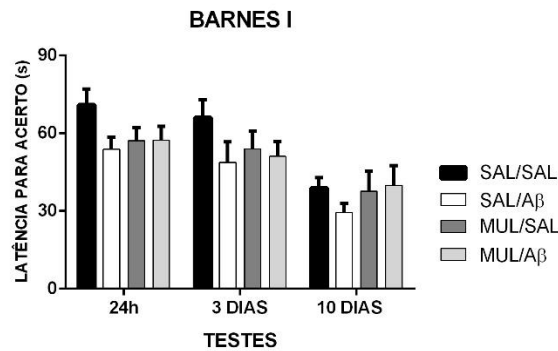


Figura 32: Parâmetros avaliados nos testes realizados 24h, 3 e 10 dias após os treinos no Barnes I de animais tratados com infusão intracerebral de salina (SAL) ou Aβ 30 pmol, concomitantemente ao tratamento por via oral com SAL ou 200 mg/kg de mulungu (MUL). Não houve diferenças entre os grupos (ANOVA de uma via). N = 8, em cada grupo.

7.4.2 Barnes II

A ANOVA mostrou efeito das exposições para o parâmetro de distância total percorrida ($F_{4,3, 121,9} = 8,47$, $p < 0,001$), onde o trial 1 difere dos *trials* finais (Bonferroni, $p < 0,05$). A porcentagem de tempo no quadrante alvo aumenta ao longo das sessões ($F_{4,73, 13,83} = 18,011$, $p < 0,001$), o primeiro trial difere dos demais (Bonferroni, $p < 0,05$) (figura 33).

Houve efeito das sessões para a latência ao acerto ($F_{1,6, 45,47} = 22,74$, $p < 0,001$) e para distância ao acerto ($F_{2,67, 74,97} = 15,085$, $p < 0,001$), indicando que redução do trial 1 aos demais (Bonferroni, $p < 0,05$). Vimos ainda aumento da latência para o primeiro erro ao longo das sessões, em que trial 3 difere do 7 ($F_{4,69, 131,44} = 3,26$, $p = 0,010$; Bonferroni, $p < 0,05$), bem como da latência para o erro secundário, com diferenças indicadas entre trial 8 e *trials* 5, 7 ($F_{7,196} = 2,85$, $p = 0,007$, Bonferroni, $p < 0,05$) (figura 33).

O número de erros totais varia ao longo das sessões para os grupos (Friedman, $X^2(7) = 62,01$, $p < 0,001$), com testes de Wilcoxon indicando redução do trial 1 para o último ($T = 101$, $p = 0,002$, $r = 0,17$) (dados não representados em figuras).

De maneira similar ao Barnes I, nos testes de 24h ou 3 dias do Barnes II também não vimos diferenças entre os grupos para nenhum dos parâmetros analisados (distância

total, latência/distância ao acerto, latência/distância para erros primário e secundário ou porcentagem de tempo no quadrante alvo, ANOVA de uma via) (figura 34). Também não verificamos diferenças entre os grupos para os parâmetros de número de acertos e erros (primários, secundários ou totais), nas sessões de testes 24h ou 3 dias (Kruskal-Wallis) (dados não representados em figuras).

BARNES II

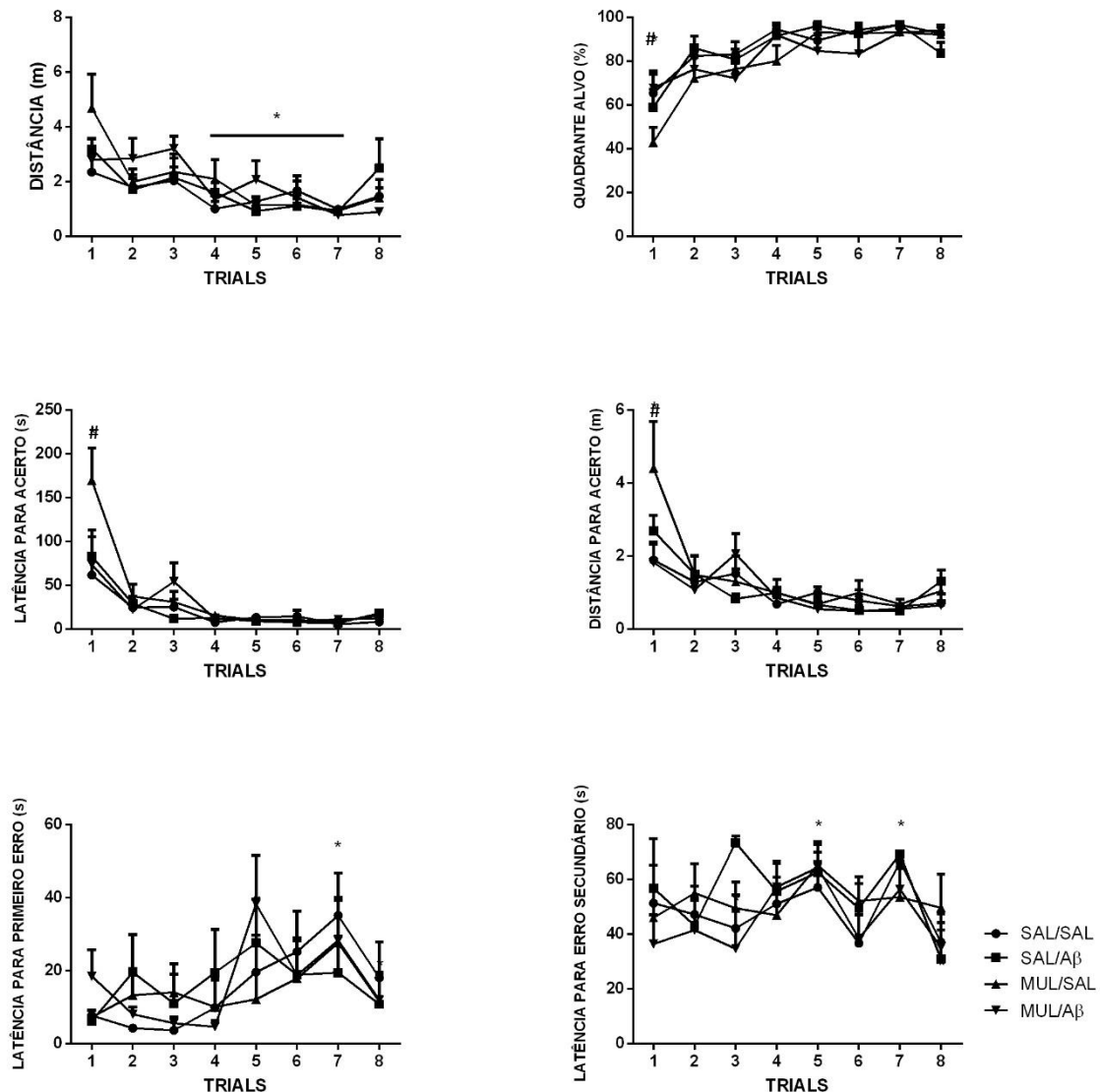


Figura 33: Parâmetros avaliados por trial no Barnes II de animais tratados com infusão intracerebral de salina (SAL) ou A β 30 pmol, concomitantemente ao tratamento por via oral com SAL ou 200 mg/kg de mulungu (MUL). Houve diferenças estatísticas ao longo das sessões para todos os parâmetros (ANOVA de medidas repetidas, Bonferroni, # $p < 0,05$

comparado aos demais *trials*, * $p < 0,05$ comparado ao trial 1). Não houve efeito do grupo. N = 8, em cada grupo.

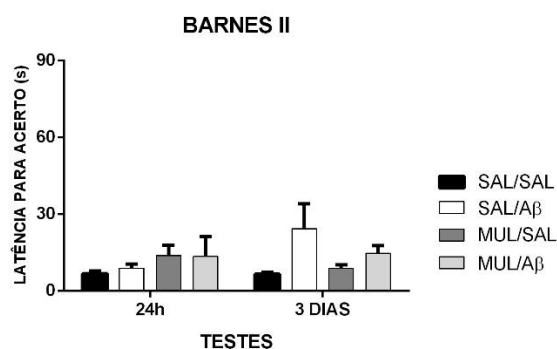


Figura 34: Parâmetros avaliados nos testes realizados 24h e 3 dias após os treinos no Barnes I de animais tratados com infusão intracerebral de salina (SAL) ou A β 30 pmol, concomitantemente ao tratamento por via oral com SAL ou 200 mg/kg de mulungu (MUL). Não houve diferenças entre os grupos (ANOVA de uma via). N = 8, em cada grupo.

7.5 Discussão

Verificamos, em ambas as sequências de Barnes, o efeito das exposições em *trials* para os parâmetros já descritos (Barnes, 1979, Sunyer et al., 2007, Pompl et al., 1999), corroborando os experimentos anteriores. Ainda, não houve efeito de grupo ou interação. Esses dados reproduzem os resultados anteriores do experimento com diferentes doses de A β indicando que em ambos não pudemos verificar os déficits previamente verificados na literatura (Nitta et al., 1994; Takeda et al. 2009; Han et al., 2011; Cioanca et al., 2013). Mesmo com a redução do número de *trials* durante os treinos nesse experimento comparado ao experimento I do capítulo III (em que utilizamos diferentes doses de A β), ainda sobre as diferenças de protocolos entre os experimentos, nesse experimento referente ao capítulo IV inserimos o teste 24h, o que pode ser interferido no teste 3 dias, impedindo a visualização de déficits na evocação do grupo sal/A β .

Foram observadas diferenças entre os grupos mul/A β comparados a sal/A β e seu controle, mul/sal, apenas para o parâmetro número de erros secundários indicando que o grupo mul/A β apresentou menor número comparado aos demais, no teste 10 dias. O número de erros secundários se refere a uma medida de memória de procedimentos (Barnes, 1979; Barrett et al., 2009), sugerindo a recidiva nos mesmos buracos errados pesquisados anteriormente, o que indicaria uma proteção pelo mulungu. Entretanto, os animais sal/A β não diferiram do seu controle, logo a interpretação de proteção não pôde ser confirmada. Ao mesmo tempo, o efeito do mulungu poderia ser devido à motivação para exploração, porém isso não foi confirmado, já que não há diferença nas distâncias percorridas no teste 10 dias.

Nossos dados não corroboraram os efeitos comportamentais positivos do mulungu, verificados em estudos anteriores. Santos e cols. (2012a) mostraram inibição de colinesterases pelo extrato aquoso e alcalóide de mulungu, tanto *in vitro*, quanto *ex vivo*, após tratamento agudo oral de diferentes doses (100, 200 ou 400mg/kg). Nesse estudo, somente a dose mais elevada do extrato aquoso (400mg/kg) foi capaz de inibir a atividade das colinesterases, enquanto todas as doses do extrato alcalóide causaram a inibição, atividade dose-dependente, sugerindo a ação anticolinesterásica do extrato e potencial terapêutico para o Alzheimer.

Outro extrato aquoso de planta asiática, *Polygonum minus* Huds (LineminusTM), cujas folhas possuem potencial antioxidante, devido à constituição flavonóide, mostrou efeito de melhora na cognição e memória de roedores submetidos à tarefa de Barnes. A disfunção cognitiva foi induzida por escopolamina e o LineminusTM na dose de 100mg/kg reduziu o número de erros primários e a latência para o alvo, bem como elevou o tempo no quadrante alvo. O efeito do extrato foi similar ao verificado por agentes já confirmados como terapêuticos, o extrato de *Ginkgo biloba* e donepezila, revertendo o déficit de memória induzido pela escopolamina e apresentando ação anticolinesterásica e antioxidante (George et al. 2014). O extrato de *Ginkgo biloba* mostrou melhora da memória, normalizando déficits cognitivos em modelos animais (Yamamoto et al. 2007), bem como em pacientes acometidos com Alzheimer (Hofferberth et al. 1994).

Extratos da planta *P. minus* apresentaram atividade inibitória da peroxidação lipídica induzida por escopolamina (Kim et al. 2009), bem como redução da atividade de espécies reativas de oxigênio, protegendo contra o declínio cognitivo (Spencer et al.

2009). O que sugere que *P. minus*, com predomínio de flavonóides apresentam efeitos antiamnésicos decorrentes da atividade antioxidante.

Morzelle et al. (2016) demonstrou os efeitos de 800mg/kg/dia de pomegranate (*Punica granatum*) sob a infusão de 0,51nmol de A β 1-42, usando mini-bombas osmóticas, ambos tratamentos foram realizados por 35 dias em camundongos, em tarefa de Barnes. Animais tratados com o extrato exibiram o comportamento de aprendizado, atingindo o alvo, enquanto o grupo A β foi incapaz de localizá-lo. O extrato também reduziu a densidade de placas, a atividade da acetilcolinesterase, a peroxidação lipídica e a concentração da citocina pró-inflamatória TNF- α , além de elevar a expressão de BDNF. Efeitos benéficos do extrato também foram visualizados em modelo transgênico de Alzheimer (Subash et al. 2015).

Esses estudos verificaram a atividade neuroprotetora de extratos com compostos alcalóides e flavonóides, revelando efeitos anticolinesterásicos e antioxidantes inclusive em modelos de A β com avaliação cognitiva (Morzelle et al. 2016; Huang et al., 2011), entretanto nossos experimentos não verificaram efeitos comportamentais positivos sobre a memória, pois ela não foi afetada pela infusão de A β 30pmol para os parâmetros clássicos do labirinto de Barnes. Algumas considerações precisam ser levantadas, nossa infusão configurou uma dose muito baixa, não utilizada na literatura (Morzelle et al. 2016; Huang et al., 2011), pois nosso intuito era a indução sutil de déficits cognitivos para pesquisa de potenciais neuroprotetores. Nossa indução foi efetivada no experimento anterior de uma única exposição ao Barnes, com redução do número de *trials* e aumento do intervalo para o teste (experimento II, capítulo III), no qual pudemos demonstrar déficits sutis decorrentes da infusão de 30pmol quanto à utilização de estratégias de busca. Nossos dados para o experimento de avaliação do potencial neuroprotetor não revelaram diferenças entre grupos conforme demonstramos ao longo dos demais experimentos, indicando que o elevado número de comparações (Field, 2005) e a repetição das tarefas reforçam o aprendizado a cada nova exposição (Barnes, 1979; Reiserer et al. 2007), eliminando sutis diferenças entre grupos. Dessa forma, seria interessante futuramente verificar os efeitos desse potencial tratamento neuroprotetor por um protocolo semelhante ao utilizado no referido experimento anterior.

8. Conclusões

- A tarefa de Barnes pôde ser executada em múltiplas sequências, configurando diferentes aprendizados, havendo reprodutibilidade nos parâmetros de memória intra-sessões e entre sequências; verificamos ainda que o implante das cânulas não influenciou negativamente o desempenho, haja vista não termos identificado diferenças significativas do seu controle sem implante (capítulo I). Assim, a tarefa pôde ser repetida e a cirurgia não prejudicou a sua execução.
- Verificamos ainda que o desenho experimental influencia o desempenho da tarefa. Aqui identificamos que distintas demandas na evocação da memória espacial produziram diferenças na maneira de atingir o objetivo da tarefa por meio da avaliação de estratégias. Além disso, os animais concluíram a tarefa mesmo na ausência de pistas distais, sugerindo uma adaptação à navegação guiada por pistas espaciais (capítulo II).
- Não conseguimos determinar diferenças entre animais submetidos a infusão de diferentes doses de peptídeos A β com a infusão sendo realizada após a primeira sequência de aprendizado (Barnes I) e com larga repetição de *trials*, o que nos levou a alterações de protocolo, no entanto, pudemos verificar a incorporação de peptídeos no tecido cerebral, ainda que sem determinação de déficits espaciais (experimento I, capítulo III).
- Ao reduzirmos o número de *trials* à metade e elevarmos o intervalo entre o aprendizado e a evocação, pudemos determinar déficits espaciais mesmo com baixa dose (30pmol). Verificamos além de redução do desempenho nos parâmetros habitualmente usados no labirinto de Barnes, alterações na estratégia de busca pelo local seguro, indicando que a infusão promoveu déficits expressos na forma de execução da tarefa, sem aboli-la (experimento II, capítulo III).
- Não foi possível verificar o potencial neuroprotetor do extrato hidroalcólico de *Erythrina velutina*, pois não identificamos efeitos positivos cognitivos, uma vez que a infusão da A β 30pmol não induziu o déficit espacial nas análises dos parâmetros habituais no labirinto de Barnes.

Referências

- Ahmed, E., et al. Isolation and cholinesterase-inhibition studies of sterols from *Haloxylon recurvum*. *Bioorg Med Chem Lett*. 16:573–580, 2006.
- Ahmed, F., et al. Cholinesterase inhibitors from botanicals. 7, 121-130, 2013.
- Akhondzadeh, S., et al. Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: A double blind, randomised, placebo controlled trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 74, 863–866, 2003b.
- Akhondzadeh, S., et al. Salvia officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: A double blind, randomized and placebo-controlled trial. *J Clin Pharm* 28, 53–59, 2003a.
- Alzheimer, A. About a peculiar disease of the cerebral cortex, 1907 (Translated by L. Jarvik and H. Greenston), *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 1, 3–8, 1987.
- Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2015: the Global Impact of Dementia. Alzheimer's Disease International; 2015.
<https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>.
- Andrade, M.T., et al. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Muell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. *Bioorg Med Chem*. 13, 4092–4095, 2005.
- Anliker, B. & Muller, U. The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener Dis* 3, 239–246, 2006.
- Arendt, T. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118,167–179, 2009.
- Arnold, S.E., et al. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 1, 103–116, 1991.
- Ata, A., et al. Triterpenoidal alkaloids from *Buxus hyrcana* and their enzyme inhibitory, anti-fungal and anti-leishmanial activities. *Phytochemistry*. 71, 1780–1786, 2010.
- Attar, A., Liu, T., Chan, W. T., Hayes, J., Nejad, M., Lei, K., & Bitan, G. (2013). A shortened Barnes maze protocol reveals memory deficits at 4-months of age in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 8(11), e80355. doi:10.1371/journal.pone.0080355.
- Albert, M. S. (1997). The ageing brain: normal and abnormal memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 352(1362), 1703-1709. doi:10.1098/rstb.1997.0152
- Ambree O, et al. (2009). Levodopa ameliorates learning and memory deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 30: 1192–1204.
- Bowen DM, et al. (1976). Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 99, 459-496.
- Balducci, C., Beeg, M., Stravalaci, M., Bastone, A., Scip, A., Biasini, E., . . . Forloni, G. (2010). Synthetic amyloid- β oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (Vol. 107, pp. 2295-2300).

Barnes, C. A., Markowska, A. L., Ingram, D. K., Kametani, H., Spangler, E. L., Lemken, V. J., & Olton, D. S. (1990). Acetyl-1-carnitine. 2: Effects on learning and memory performance of aged rats in simple and complex mazes. *Neurobiol Aging*, 11(5), 499-506.

Barrett, G. L., Bennie, A., Trieu, J., Ping, S., & Tsafoulis, C. (2009). The chronology of age-related spatial learning impairment in two rat strains, as tested by the Barnes maze. *Behav Neurosci*, 123(3), 533-538. doi:10.1037/a0015063

Bohbot, V. D., Lerch, J., Thorndycraft, B., Iaria, G., & Zijdenbos, A. P. (2007). Gray matter differences correlate with spontaneous strategies in a human virtual navigation task. *J Neurosci*, 27(38), 10078-10083. doi:10.1523/jneurosci.1763-07.2007

Brandeis, R., Brandys, Y., & Yehuda, S. (1989). The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci*, 48(1-2), 29-69.

Buzsaki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci*, 16(2), 130-138. doi:10.1038/nn.3304
Cohen NJ, Eichenbaum H (1993) Memory, amnesia and the hippocampal system. MIT Press, Cambridge.

Bach M.E, H.R., Osman M, Kandel E.R., Mayford M. (1995). Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell Mol Biol Lett* 6(16; 81), 905-915.

Bohbot, V. D., Iaria, G., and Petrides, M. (2004). Hippocampal function and spatial memory: evidence from functional neuroimaging in healthy participants and performance of patients with medial temporal lobe resections. *Neuropsychology*, 18(3), 418-425. doi:10.1037/0894-4105.18.3.418

Braak, H., and Braak, E. (1991a). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol*, 1(3), 213-216.

Braak, H., and Braak, E. (1991b). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4), 239-259.

Braak, H. et al. Vulnerability of cortical neurons to Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Alzheimers Dis* 9, 35-44, 2006.

Braak, H., et al. Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett* 65, 351-355, 1986.
Brazil, 1997.

Braak, H., Jellinger, K., Braak, E., and Bohl, J. (1992). Allocortical neurofibrillary changes in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol*, 84(5), 478-483.

Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 93(1), 74-104.

Barnes, C. A., Eppich, C., & Rao, G. (1989). Selective improvement of aged rat short-term spatial memory by 3,4-diaminopyridine. *Neurobiol Aging*, 10(4), 337-341.

Barnes, C. A., Markowska, A. L., Ingram, D. K., Kametani, H., Spangler, E. L., Lemken, V. J., & Olton, D. S. (1990). Acetyl-1-carnitine. 2: Effects on learning and memory performance of aged rats in simple and complex mazes. *Neurobiol Aging*, 11(5), 499-506.

- Barnes, C. A., Nadel, L., & Honig, W. K. (1980). Spatial memory deficit in senescent rats. *Can J Psychol*, 34(1), 29-39.
- Blanchard, J., Decorte, L., Nogues, X., & Micheau, J. (2009). Characterization of cognition alteration across the course of the disease in APP751SL mice with parallel estimation of cerebral Abeta deposition. *Behav Brain Res*, 201(1), 147-157. doi:10.1016/j.bbr.2009.02.005
- Blanchard, J., Martel, G., Guillou, J. L., Nogues, X., & Micheau, J. (2008). Impairment of spatial memory consolidation in APP(751SL) mice results in cue-guided response. *Neurobiol Aging*, 29(7), 1011-1021. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.010
- Ball, M.J. Topographic distribution of neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in hippocampal cortex of aging and demented patients. A quantitative study. *Acta Neuropathol* 42, 73-80, 1978.
- Ballard, C., et al. Alzheimer's disease. *Lancet*, 377, 1019-1031, 2011.
- Barnes, D.E. & Yaffe, K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol*. 10, 819-828, 2011.
- Beach, T., et al. Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia* 2, 420-436, 1989.
- Beard, C.M. et al. Lack of association between Alzheimer's disease and education, occupation, marital status, or living arrangement. *Neurology* 42, 2063-2068, 1992.
- Bennett, B.D., et al. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem* 275, 20647-20651, 2000.
- Bennett, D.A., et al. Pathological changes in frontal cortex from biopsy to autopsy in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 14, 589-596, 1993.
- Bezprozvanny, I. The rise and fall of Dimebon. *Drug News Perspect*. 23, 518-523, 2010.
- Blurton-Jones, M. & LaFerla, F.M. Pathways by which A_β facilitates tau pathology. *Curr. Alzheimer Res*. 3, 437-448, 2006.
- Bonaiuto, S. et al. Education and occupation as risk factors for dementia: a population-based case-control study. *Neuroepidemiology* 14, 101-109, 1995.
- Bosman, G.J., et al. Alzheimer's disease and cellular aging: membrane-related events as clues to primary mechanisms. *Gerontology* 37, 95-112, 1991.
- Boveris, A & Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 134, 707-716, 1973.
- Busciglio, J., et al. β -Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14, 879-888, 1995.
- Butler, S.M. et al. Age, education, and changes in the Mini-Mental State Exam scores of older women: findings from the Nun Study. *J Am Geriatr Soc* 44, 675-681, 1996.
- Cao, X. & Sudhof, T.C. A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120, 2001.
- Carlini, E.A., et al. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citrates* Staph). I: effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *Journal of pharmacology* 17, 37-64, 1986.
- Carvalho, A.C., et al. Evidence of the mechanism of action of *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae) leaves aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 122, 374-378, 2009.
- Castellani, R.J., et al. Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine and hexitollysine. *Free Radic Biol Med* 31, 175-180, 2001.

- Castellani, R.J., et al. Alzheimer disease pathology as a host response. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 523–531, 2008.
- Castellani, R.J., et al. Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. *Ageing Res Rev* 3, 319–326, 2004.
- Castellani, R.J., et al. Hydroxynonenal adducts indicate a role for lipid peroxidation in neocortical and brainstem Lewy bodies in humans. *Neurosci Lett* 319, 25–28, 2002.
- Castellani, R. J. et al. Alzheimer Disease. *Dis Mon* 56(9), 484–546, 2010.
- Cao, X. & Sudhof, T.C. A transcriptively active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115–120, 2001.
- Carvalho, A.C., et al. Evidence of the mechanism of action of *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae) leaves aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 122, 374–378, 2009.
- Chan, J. & Lumen, B.O. Properties of trypsin inhibitor from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seed isolated by affinity chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30, 42–46, 1982.
- Chen, S.-Y., et al. The neurochemical and behavioral effects of β -amyloid peptide (25–35). *Brain Res* 720, 54–60, 1996.
- Choudhary, M.I., et al. New alkaloids from *Buxus papilosa*. *J Nat Prod.* 50, 84–88, 1987.
- Cleary, J.P., et al. Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8, 79–84, 2005.
- Clayton, N. S., & Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*, 395(6699), 272–274. doi:10.1038/26216
- Clinton, L. K., Billings, L. M., Green, K. N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., . . . LaFerla, F. M. (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis*, 28(1), 76–82. doi:10.1016/j.nbd.2007.06.013
- Cole, A. J., Saffen, D. W., Baraban, J. M., & Worley, P. F. (1989). Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature*, 340(6233), 474–476. doi:10.1038/340474a0
- Cleveland, D.W. et al. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* 116, 227–247, 1977.
- Cole, G.M. & Frautschy, S.A. Mechanisms of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 140–148, 2010.
- Coleman, M.P. & Perry, V.H. Axon pathology in neurological disease: A neglected therapeutic target. *Trends Neurosci* 25, 532–537, 2002.
- Coyle, J. T., et al. Alzheimer's disease: a disorder of central cholinergic innervation. *Science* 219, 1184–1190, 1983.
- Craveiro, A.C.S., et al. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. *Brazilian J Pharmacog*, 18, 739–743, 2008.
- Crews, L. & Masliah, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 19, 12–20, 2010.

Crews, L., et al. APP transgenic modeling of Alzheimer's disease: Mechanisms of neurodegeneration and aberrant neurogenesis. *Brain Struct Funct* 214, 111–126, 2010.

Cummings, J.L. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 56–67, 2004.

Cioanca, O., Hritcu, L., Mihasan, M., and Hancianu, M. (2013). Cognitive-enhancing and antioxidant activities of inhaled coriander volatile oil in amyloid beta(1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Physiol Behav* 120, 193-202. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.08.006.

Chapman, P. F., White, G. L., Jones, M. W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V. J., Irizarry, M., Hsiao, K. K. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci*, 2(3), 271-276. doi:10.1038/6374

Chen, G., Chen, K. S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S. J., Morris, R. G. (2000). A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 408(6815), 975-979. doi:10.1038/35050103

Da Cunha, E.V.L., et al. Eryvellutinone, an isoflavanone from the stem bark of *Erythrina vellutina*. *Phytochemistry* 43, 1371–1373, 1996.

Cohen-Salmon C, et al (1997) Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on learning and possible actions on aging. *J Physiol Paris* 91(6):291–300.

Crusio WE. Methodological considerations for testing learning in mice. In: Crusio WE, Gerlai RT, editor. *Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research*. Vol. 13. Amsterdam: Elsevier; 1999. pp. 638–651.

Cushman LA, Stein K, Duffy CJ. Detecting navigational deficits in cognitive aging and Alzheimer disease using virtual reality. *Neurology*. 71(12):888–895, 2008. [PubMed: 18794491]

D'Hooze R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 36(1):60–90.

Davies P, Maloney AJ (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403.

Deipolyi, A. R., Fang, S., Palop, J. J., Yu, G. Q., Wang, X., & Mucke, L. (2008). Altered navigational strategy use and visuospatial deficits in hAPP transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 29(2), 253-266. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.10.021

Dantas, M.C., et al. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 129–133, 2004.

Das, A., et al. A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba* anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacol Biochem Behav.* 73, 893–900, 2002.

Davis, S., Bozon, B., & Laroche, S. (2003). How necessary is the activation of the immediate early gene zif268 in synaptic plasticity and learning? *Behav Brain Res*, 142(1-2), 17-30.

Deacon, R. M., & Rawlins, J. N. (2002). Learning impairments of hippocampal-lesioned mice in a paddling pool. *Behav Neurosci*, 116(3), 472-478.

Desikan, R. S., McEvoy, L. K., Holland, D., Thompson, W. K., Brewer, J. B., Aisen, P. S., Dale, A. M. (2013). Apolipoprotein E epsilon4 does not modulate amyloid-

beta-associated neurodegeneration in preclinical Alzheimer disease. *AJNR Am J Neuroradiol*, 34(3), 505-510. doi:10.3174/ajnr.A3267

Dragunow, M., Xu, R., Walton, M., Woodgate, A., Lawlor, P., MacGibbon, G. A., . . . During, M. (2000). c-Jun promotes neurite outgrowth and survival in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 83(1-2), 20-33.

Decker, H., et al. Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3beta in primary cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 30, 9166–9171, 2010.

DeKosky, S.T. & Scheff, S.W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27, 457–464, 1990.

DeKosky, S.T., et al. Structural correlates of cognition in dementia: Quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration* 5, 417–421, 1996.

Dickey, C. A., Gordon, M. N., Mason, J. E., Wilson, N. J., Diamond, D. M., Guzowski, J. F., & Morgan, D. (2004). Amyloid suppresses induction of genes critical for memory consolidation in APP + PS1 transgenic mice. *J Neurochem*, 88(2), 434-442.

Dickey, C. A., Loring, J. F., Montgomery, J., Gordon, M. N., Eastman, P. S., & Morgan, D. (2003). Selectively reduced expression of synaptic plasticity-related genes in amyloid precursor protein + presenilin-1 transgenic mice. *J Neurosci*, 23(12), 5219-5226.

Dickerson, B.C., et al. Alzheimer-signature MRI biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults. *Neurology* 76, 2011.

Dickerson, B.C., et al. The cortical signature of Alzheimer's disease: Regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. *Cereb Cortex* 19, 497–510, 2009.

Driscoll, I., et al. Impact of Alzheimer's pathology on cognitive trajectories in nondemented elderly. *Ann Neurol* 60, 688–695, 2006.

Du, H., et al. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 14, 1097–1105, 2008.

Edbauer, D. et al. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5, 486–488, 2003.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I. Behavioral data. *Behav Brain Res* 31, 47–59, 1988.

Eustache, F., Piolino, P., Giffard, B., Viader, F., De La Sayette, V., Baron, J. C., and Desgranges, B. (2004). 'In the course of time': a PET study of the cerebral substrates of autobiographical amnesia in Alzheimer's disease. *Brain*, 127(Pt 7), 1549-1560. doi:10.1093/brain/awh166

Ellis KA, et al. Decline in cognitive function over 18 months in healthy older adults with high amyloid-b. *J Alzheimers Dis*, 34: 861–71, 2013.

Eichenbaum, H., Yonelinas, A. P., & Ranganath, C. (2007). The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci*, 30, 123-152. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094328

Evans, G. W., Brennan, P. L., Skorpanich, M. A., & Held, D. (1984). Cognitive mapping and elderly adults: verbal and location memory for urban landmarks. *J Gerontol*, 39(4), 452-457.

- Farlow M. 2007. Alzheimer's disease. *Continuum Lifelong. Learning Neurol* 13: 39 – 68.
- Forstl H. 2010. What is Alzheimer's disease? In *Dementia* (ed. Ames D, O'Brien J, Burns A), p. 434. Hodder Education, London.
- Frank M. LaFerla, F.M.; Oddo, S. Alzheimer's disease: Ab, tau and synaptic dysfunction. *TRENDS in Molecular Medicine*, 11, 2005. doi:10.1016/j.molmed.2005.02.009
- Fukumoto, H., et al. beta-Secretase Protein and Activity Are Increased in the Neocortex in Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 59, 1381–1389, 2002.
- Fukumoto, H., Tokuda, T., Kasai, T., Ishigami, N., Hidaka, H., Kondo, M., . . . Nakagawa, M. (2010). High-molecular-weight beta-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Faseb j*, 24(8), 2716-2726. doi:10.1096/fj.09-150359.
- Fan, S. & Wu, G. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46, 273–292, 2005.
- Fanselow, M. S., & Poulos, A. M. (2005). The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu Rev Psychol*, 56, 207-234. doi:10.1146/annurev.psych.56.091103.070213
- Field, A. IN: Descobrimos a estatística usando SPSS. Porto Alegre: Artmed, 2009. 2ªed.
- Finkbeiner, S., & Greenberg, M. E. (1998). Ca²⁺ channel-regulated neuronal gene expression. *J Neurobiol*, 37(1), 171-189.
- Frazer, M. E., Hughes, J. E., Mastrangelo, M. A., Tibbens, J. L., Federoff, H. J., & Bowers, W. J. (2008). Reduced pathology and improved behavioral performance in Alzheimer's disease mice vaccinated with HSV amplicons expressing amyloid-beta and interleukin-4. *Mol Ther*, 16(5), 845-853. doi:10.1038/mt.2008.39
- French, P. J., O'Connor, V., Jones, M. W., Davis, S., Errington, M. L., Voss, K., . . . Bliss, T. V. (2001). Subfield-specific immediate early gene expression associated with hippocampal long-term potentiation in vivo. *Eur J Neurosci*, 13(5), 968-976.
- Flausino Jr., O.A., et al. Effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae) in mice submitted to animal models of anxiety. *Biol Pharm Bull* 30, 375-378, 2007a.
- Flood, J. F. & Cherkin, A., Scopolamine effects on memory retention in mice: A model of dementia? *Behavioral and Neural Biology*. v. 45, p. 169–184, 1986.
- Flood, J. F., et al. Amnesic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid β protein from patients with Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3363-3366, 1991.
- Folkers, K. & Shavel, J. *Erythrina* alkaloids. XII. Chromatographic analyses of erysodine, erysovine and "Erysocine" and technique for preparative isolation. *Journal of American Chemical Society* 64, 1892–1896, 1951.
- Fox, N.C., et al. Presymptomatic hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. A longitudinal MRI study. *Brain* 119, 2001–2007, 1996.
- Foster, T. C. (1999). Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res Brain Res Rev*, 30(3), 236-249.

Foster, T. C., Evelyn F. and William L. McKnight (2012). Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 4. doi:10.3389/fnagi.2012.00012

Frautschy, S.A., Yang, F., Calderon, L., and Cole, G.M. (1996). Rodent models of Alzheimer's disease: rat A beta infusion approaches to amyloid deposits. *Neurobiol Aging* 17(2), 311-321.

Fratiglioni, L. et al. Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging* 15, 365–375, 1999.

Gao, Y. & Pimplikar, S.W. The gamma-secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14979–14984, 2001.

Garcia-Mateos, R., et al. Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to Mexico. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26, 545-551, 1981.

Geula, C., et al. Aging renders the brain vulnerable to amyloid β -protein neurotoxicity. *Nat Med* 4, 827- 831, 1998.

Giannakopoulos, P., et al. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease.

Giasson, B. I. et al. Interactions of amyloidogenic proteins. *Neuromolecular Medicine*, 4, 49–58, 2003.

Giovannelli, L., et al. Differential effects of amyloid peptides b(1 \pm 40) and b(25 \pm 35) injections into the rat nucleus basalis. *Neuroscience* 66, 781-792, 1995.

Giulian, D., et al. The HHQK domain of β -amyloid provides a structural basis for the immunopathology of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 273, 29719-29726, 1998.

Glabe, C.C. Amyloid accumulation and pathogenesis of Alzheimer's disease: Significance of monomeric, oligomeric and fibrillar Ab. *Subcell Biochem* 38, 167–177, 2005.

Glenner, G. G. & Wong, C. W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 122, 1131–1135, 1984.

Gilbert, P. E., Kesner, R. P., & Lee, I. (2001). Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus*, 11(6), 626-636. doi:10.1002/hipo.1077

Goate, A. et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349, 704–706, 1991.

Gómez-Isla, T., et al. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41, 17–24, 1997.

Gómez-Isla, T., et al. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16, 4491–4500, 1996.

Gong, C.X., et al. Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase-2B (calcineurin). *J. Neurochem.* 62, 803–806, 1994.

Gong, C.X., et al. Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.* 61, 921–927, 1993.

González-gonzález, Y., et al. Screening of serine proteinase inhibitors from marine organisms. *Biotechnologia Aplicada* 20, 111–114, 2003.

Granholm, E. & Butters, N. Associative encoding and retrieval in Alzheimer's and Huntington's disease. *Brain Cogn.* 7, 335–347, 1988.

Graves, A.B. et al. The association between head trauma and Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol* 131, 491–501, 1990.

George et al. In vitro and ex-vivo cellular antioxidant protection and cognitive enhancing effects of an extract of *Polygonum minus* Huds (Lineminus™) demonstrated in a Barnes Maze animal model for memory and learning. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014,14:161.

Goodrich-Hunsaker, N. J., Livingstone, S. A., Skelton, R. W., and Hopkins, R. O. (2010). Spatial deficits in a virtual water maze in amnesic participants with hippocampal damage. *Hippocampus*, 20(4), 481-491. doi:10.1002/hipo.20651

Gravina, S. A., Ho, L., Eckman, C. B., Long, K. E., Otvos, L., Jr., Younkin, L. H., Younkin, S. G. (1995). Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). *J Biol Chem*, 270(13), 7013-7016.

Grundke-Iqbal, I., et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4913–4917, 1986.

Grutzendler, J., et al. Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 1097, 30–39, 2007.

Goelet, P., Castellucci, V. F., Schacher, S., & Kandel, E. R. (1986). The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature*, 322(6078), 419-422. doi:10.1038/322419a0

Guzowski, J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*, 12(1), 86-104. doi:10.1002/hipo.10010

Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2000). Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci*, 20(11), 3993-4001.

Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., & McGaugh, J. L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci*, 21(14), 5089-5098.

Glenner, G.G.; Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1131–1135.

Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., . . . Hyman, B. T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 41(1), 17-24. doi:10.1002/ana.410410106

Gomez-Isla, T., Price, J. L., McKeel, D. W., Jr., Morris, J. C., Growdon, J. H., & Hyman, B. T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 16(14), 4491-4500.

Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436(7052), 801-806. doi:10.1038/nature03721

Hardy, J. and Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.

Hebert LE, et al. 2003. Alzheimer disease in the US population: Prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol.* 60: 1119 – 1122.

Hardy, J., & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 12(10), 383-388.

Hendrickx, A., Pierrot, N., Tasiaux, B., Schakman, O., Kienlen-Campard, P., De Smet, C., & Octave, J. N. (2014). Epigenetic regulations of immediate early genes expression involved in memory formation by the amyloid precursor protein of Alzheimer disease. *PLoS One*, 9(6), e99467. doi:10.1371/journal.pone.0099467

Holscher, C. (1999). Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res*, 100(1-2), 225-235.

Hsia, A. Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G. Q., Tatsuno, G., Hu, K., . . . Mucke, L. (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6), 3228-3233.

Huang, Y., & Mucke, L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, 148(6), 1204-1222. doi:10.1016/j.cell.2012.02.040

Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2001). Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci*, 21(6), 2186-2193.

Hamm, V., Heraud, C., Bott, J. B., Herbeaux, K., Strittmatter, C., Mathis, C., and Goutagny, R. (2017). Differential contribution of APP metabolites to early cognitive deficits in a TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Adv*, 3(2), e1601068. doi:10.1126/sciadv.1601068

Han, M., Liu, Y., Tan, Q., Zhang, B., Wang, W., Liu, J., et al. (2011). Therapeutic efficacy of stemazole in a beta-amyloid injection rat model of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 657(1-3), 104-110. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.01.065.

Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356. doi:10.1126/science.1072994

Head, D., and Isom, M. (2010). Age effects on wayfinding and route learning skills. *Behav Brain Res*, 209(1), 49-58. doi:10.1016/j.bbr.2010.01.012

Harrison, F. E., Reiserer, R. S., Tomarken, A. J., & McDonald, M. P. (2006). Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learn Mem*, 13(6), 809-819. doi:10.1101/lm.334306

Hasselmo, M. E., Schnell, E., & Barkai, E. (1995). Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *J Neurosci*, 15(7 Pt 2), 5249-5262.

Halldorsdottir, E.S., et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of lycopodane-type alkaloids from the Icelandic *Lycopodium annotinum* ssp. alpestre. *Phytochemistry*. 71, 149–57, 2010.

Hardy, J. & Selkoe, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356, 2002.

Hardy, J.A. & Higgins, G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185, 1992.

Harkany, T., et al. β -Amyloid (Phe(SO₃)₂₄)₂₅± 35 in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation. *Behav Brain Res* 90,133-145, 1998.

- Harkany, T., et al. Propionyl-IIGL tetrapeptide antagonizes β -amyloid excitotoxicity in rat nucleus basalis. *Neuroreport* 10, 1693-1698, 1999.
- Harris, J.A., et al. Transsynaptic progression of amyloid- β -induced neuronal dysfunction within the entorhinal-hippocampal network. *Neuron* 68, 428-441, 2010a.
- Harris, J.A., et al. Many neuronal and behavioral impairments in transgenic mouse models of Alzheimer's disease are independent of caspase cleavage of the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 30, 372-381, 2010b.
- Hegde, V.R., et al. Phospholipase A2 inhibitors from an *Erythrina* species from Samoa. *Journal of Natural Products* 60, 537-539, 1997.
- Herrup, K. Reimagining Alzheimer's disease—an age-based hypothesis. *J. Neurosci.* 30, 16755-16762, 2010.
- Higuchi, M. et al. Tau and axonopathy in neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 2, 131-150, 2002.
- Hirano, A. & Zimmerman, H.M. Silver impregnation of nerve cells and fibers in celloidin sections. A simple impregnation technique. *Arch Neurol* 6, 114-122, 1962.
- Holsinger, R.M., et al. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 51, 783-786, 2002.
- Hsieh, H., et al. AMPAR removal underlies Ab induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52, 831-843, 2006.
- Huang, S.M., et al. Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. *J Biol Chem* 281, 17941-17951, 2006.
- Huang, Y. & Lennart, M. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *The cell* 1204-1222, 2012.
- Hussain, I., et al. Identification of a Novel Aspartic Protease (Asp 2) as beta-Secretase. *Mol Cell Neurosci* 14, 419-427, 1999.
- Hyman, B.T., et al. Alzheimer's disease: Cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225, 1168-1170, 1984.
- Hyman, B.T., et al. Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 20, 472-481, 1986.
- Hamaguchi, T. et al. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid- β aggregation pathway. *Am J Pathol* 175, 2557-2565, 2009.
- Hirano, A. & Zimmerman, H.M. Silver impregnation of nerve cells and fibers in celloidin sections. A simple impregnation technique. *Arch Neurol* 6, 114-122, 1962.
- Hofferberth B. The efficacy EGb 761 in patients with senile dementia of the Alzheimer type, a double-blind, placebo-controlled study on different levels of investigation. *Hum Psychopharm* 1994, 9:215-222.
- Holmes, A., Wrenn, C. C., Harris, A. P., Thayer, K. E., & Crawley, J. N. (2002). Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes Brain Behav*, 1(1), 55-69.
- Hunsaker, M. R., Rosenberg, J. S., & Kesner, R. P. (2008). The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. *Hippocampus*, 18(10), 1064-1073. doi:10.1002/hipo.20464
- Iqbal, K. & Grundke-Iqbal, I. Neurofibrillary pathology leads to synaptic loss and not the other way around in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 4, 235-238, 2002.
- Iqbal, K., et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 198-210, 2005.

Itagaki, S., et al. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol* 24, 173–182, 1989.

Itoh, A. et al. Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in β -amyloid protein-infused rats. *J Neurochem* 66, 1113–1117, 1996.

Iwata, N., et al. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med*. 6, 143–150, 2000.

Iwata, N., et al. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292, 1550–1552, 2001.

Iaria, G., Palermo, L., Committeri, G., and Barton, J. J. (2009). Age differences in the formation and use of cognitive maps. *Behav Brain Res*, 196(2), 187–191. doi:10.1016/j.bbr.2008.08.040

Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*, 13(1), 45–53.

Ishii K, Kawachi T, Sasaki H, Kono AK, Fukuda T, Kojima Y, et al. Voxel-based morphometric comparison between early- and late-onset mild Alzheimer's disease and assessment of diagnostic performance of z score images. *AJNR Am J Neuroradiol*. 26(2):333–340, 2005. [PubMed: 15709131].

Jack CR, et al. Brain b-amyloid load approaches a plateau. *Neurology* 80, 1–7, 2013.

Jack CR, Jr, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*. 9:119–28, 2010.

Jack Jr., C.R., et al. Prediction of AD with MRI-based hippocampal volume in mild cognitive impairment. *Neurology* 52, 1397–1403, 1999.

Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., . . . Borchelt, D. R. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet*, 13(2), 159–170. doi:10.1093/hmg/ddh019

Johnson, K. A., Fox, N. C., Sperling, R. A., & Klunk, W. E. (2012). Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(4), a006213. doi:10.1101/cshperspect.a006213

Jansen, P., Schmelter, A., and Heil, M. (2010). Spatial knowledge acquisition in younger and elderly adults: a study in a virtual environment. *Exp Psychol*, 57(1), 54–60. doi:10.1027/1618-3169/a000007

Janus, C. (2004). Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learn Mem*, 11(3), 337–346. doi:10.1101/lm.70104

Jessberger, S., & Kempermann, G. (2003). Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci*, 18(10), 2707–2712.

Jones, M. W., Errington, M. L., French, P. J., Fine, A., Bliss, T. V., Garel, S., . . . Davis, S. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci*, 4(3), 289–296. doi:10.1038/85138

- Jones, M. W., & McHugh, T. J. (2011). Updating hippocampal representations: CA2 joins the circuit. *Trends Neurosci*, 34(10), 526-535. doi:10.1016/j.tins.2011.07.007
- Jiang, Z.Y., et al. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*. 26, 853-856, 1991.
- Jin, K., et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* 101, 343-347, 2004.
- Jo, J., et al. Ab(1-42) inhibition of LTP is mediated by a signaling pathway involving caspase-3, Akt1 and GSK-3 β . *Nat. Neurosci*. 14, 545-547, 2011.
- Joubert, F.J. Purification and properties of the proteinase inhibitors from *Erythrina caffra* (coast *Erythrina*) seed. *The International Journal of Biochemistry* 14, 187-193, 1982.
- Joubert, F.J., et al. Purification and some properties of two proteinase inhibitors (DE-1 and DE-3) from *Erythrina latissima* (broad-leaved *erythrina*) seed. *Hoppe Seylers Zeitschrift fur Physiologische Chemie* 362, 531-538, 1981.
- Jung, H. A., et al. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis rhizoma* alkaloids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32, 1433-1438, 2009.
- Kalaria, R.N. The immunopathology of Alzheimer's disease and some related disorders. *Brain Pathol* 3, 333-347, 1993.
- Kamenetz, F., et al. APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925-937, 2003.
- Kang, J., et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A β protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325, 733-736, 2011.
- Katzman, R. Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease. *Neurology* 43,13-20, 1993.
- Kayed, R., et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486-489, 2003.
- Kang, S., Moon, N. R., Kim, D. S., Kim, S. H., and Park, S. (2015). Central acylated ghrelin improves memory function and hippocampal AMPK activation and partly reverses the impairment of energy and glucose metabolism in rats infused with beta-amyloid. *Peptides*, 71, 84-93. doi:10.1016/j.peptides.2015.07.005
- Kaskie, B., and Storandt, M. (1995). Visuospatial deficit in dementia of the Alzheimer type. *Arch Neurol*, 52(4), 422-425.
- Kowall, N. W., Beal, M. F., Busciglio, J., Duffy, L. K., and Yankner, B. A. (1991). An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(16), 7247-7251.
- Kumaran, D., Hassabis, D., Spiers, H. J., Vann, S. D., Vargha-Khadem, F., and Maguire, E. A. (2007). Impaired spatial and non-spatial configural learning in patients with hippocampal pathology. In *Neuropsychologia* (Vol. 45, pp. 2699-2711).
- Kidd M. Alzheimer's Disease--an Electron Microscopical Study. *Brain* 87, 307-320, 1964.
- Kim, D.K. Inhibitory effect of corynoline isolated from the aerial parts of *Corydalis incisa* on the acetylcholinesterase. *Arch Pharm Res*. 25, 817-819, 2002.
- Kim, J.H., et al. Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of (b)-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo. *J Neurosci* 21, 1327-1333, 2001.

Kim S, et al. Forsythiaside, a Constituent of the Fruits of *Forsythia suspensa*, Ameliorates Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice. *Biomol Ther*, 17(3):249–255, 2009.

Kimberly, W.T., et al. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6382–6387, 2003.

Kimberly, W.T., et al. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276, 40288–40292, 2001.

Kimura, M., et al. Amino Acid Sequence of Chymotrypsin Inhibitor ECI from the Seeds of *Erythrina variegata* (LINN.) var. *Orientalis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 57, 102–106, 1993.

Kishimura, H., et al. A Trypsin Inhibitor in the Viscera of Japanese Common Squid (*Todarodes Pacificus*) Elicits Insulinotropic Effects in Diabetic Gk Rats. *Journal of Food Biochemistry* 36, 93–98, 2012.

Klein, W.L. Ab toxicity in Alzheimer's disease: Globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41, 345–352, 2002.

Klein, W.L. et al. Targeting small Ab oligomers: The solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24, 219–224, 2001.

Klucken, J., et al. Neuritic alterations and neural system dysfunction in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurochem Res* 28, 1683–1691, 2003.

Klyubin, I., et al. Amyloid b protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: Prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci* 28, 4231–4237, 2008.

Knowles, R.B., et al. Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* 96, 5274–5279, 1999.

Kòbaiashi, M., et al. Indonesian medicinal plants. XXI. Inhibitors of Na⁺/K⁺ exchanger from the bark of *Erythrina variegata* and the roots of *Maclura cochinchinensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 45, 1615–1619, 1997.

Koh, M.T., et al. Treatment strategies targeting excess hippocampal activity benefit aged rats with cognitive impairment. *Neuropsychopharmacology* 35, 1016–1025, 2010.

Komarnytsky, S., et al. Potato protease inhibitors inhibit food intake and increase circulating cholecystokinin levels by a trypsin-dependent, 2011.

Kouzuma, Y., et al. Isolation and primary structure of proteinase inhibitors from *Erythrina variegata* (LINN) var. *Orientalis* Seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56, 1819–1824, 1992.

Kowall, W. N., et al. An in vivo model for the neurodegenerative effects of b-amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7247–7251, 1991.

Kromer, L.J., et al. Pathological alterations in the amygdale in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 37, 377–385, 1990.

Kesner, R. P., Lee, I., & Gilbert, P. (2004). A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev Neurosci*, 15(5), 333–351.

Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, 256(5057), 675–677.

- Knapska, E., & Kaczmarek, L. (2004). A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? *Prog Neurobiol*, 74(4), 183-211. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.05.007
- Kogan, J. H., Frankland, P. W., Blendy, J. A., Coblentz, J., Marowitz, Z., Schutz, G., & Silva, A. J. (1997). Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr Biol*, 7(1), 1-11.
- Koopmans, G., Blokland, A., van Nieuwenhuijzen, P., & Prickaerts, J. (2003). Assessment of spatial learning abilities of mice in a new circular maze. *Physiol Behav*, 79(4-5), 683-693.
- Kessels, R. P., de Haan, E. H., Kappelle, L. J., & Postma, A. (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Brain Res Rev*, 35(3), 295-303.
- Konrath, E.L., et al. 2013. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. doi: 10.1111/jphp.12090
- Larson ME, et al. (2012). Soluble a-synuclein is a novel modulator of Alzheimer's disease pathophysiology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 32: 10253–10266.
- Lim YY, et al. Cognitive decline in adults with mild cognitive impairment and high Ab amyloid: Prodromal Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*. 33: 1167–76, 2013.
- Langbaum, J. B., Fleisher, A. S., Chen, K., Ayutyanont, N., Lopera, F., Quiroz, Y. T., . . . Reiman, E. M. (2013). Ushering in the study and treatment of preclinical Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 9(7), 371-381. doi:10.1038/nrneurol.2013.107
- Lesne, S. E., Sherman, M. A., Grant, M., Kuskowski, M., Schneider, J. A., Bennett, D. A., & Ashe, K. H. (2013). Brain amyloid-beta oligomers in ageing and Alzheimer's disease. *Brain*, 136(Pt 5), 1383-1398. doi:10.1093/brain/awt062
- Lamprecht, R., & Dudai, Y. (1996). Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory. *Learn Mem*, 3(1), 31-41.
- Leao, A. H., Medeiros, A. M., Apolinario, G. K., Cabral, A., Ribeiro, A. M., Barbosa, F. F., & Silva, R. H. (2016). Hippocampal-dependent memory in the plus-maze discriminative avoidance task: The role of spatial cues and CA1 activity. *Behav Brain Res*, 304, 24-33. doi:10.1016/j.bbr.2016.02.012
- Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2005). Place cells, spatial maps and the population code for memory. *Curr Opin Neurobiol*, 15(6), 738-746. doi:10.1016/j.conb.2005.10.002
- Lorincz, A., & Buzsaki, G. (2000). Two-phase computational model training long-term memories in the entorhinal-hippocampal region. *Ann N Y Acad Sci*, 911, 83-111.
- Lynch, G., & Granger, R. (1992). Variations in synaptic plasticity and types of memory in corticohippocampal networks. *J Cogn Neurosci*, 4(3), 189-199. doi:10.1162/jocn.1992.4.3.189
- Lacor, P.N. et al. Ab oligomerinduced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27, 796–807, 2007.
- Ladner, C.J., et al. Reduction of calcineurin enzymatic activity in Alzheimer's disease: correlation with neuropathologic changes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 924–931, 1996.
- LaFerla, F. & Duff, K. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011.

- LaFerla, F.M. et al. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499–509, 2007.
- Lambert, M.P., et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Ab1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci* 95, 6448–6453, 1998.
- Lane, R.M., et al. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol*, 9, 101–124, 2006.
- Lee, H.P., et al. Antioxidant approaches for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Rev. Neurother.* 10, 1201–1208, 2010.
- Lehman, A.J. Actions of *Erythrina americana*, a possible curare substitute. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 60-69, 1937.
- Lesne, S., et al. A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352–357, 2006.
- Levy-Lahad, E. et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, 269, 973–977, 1995.
- Li, B., et al. Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 78–84, 2008.
- Li, S., et al. Soluble Ab oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J. Neurosci.* 31, 6627–6638, 2011.
- Li, S., et al. Soluble oligomers of amyloid β protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 62, 788–801, 2009.
- Lima, T.B., et al. A Kunitz Proteinase Inhibitor from Corms of *Xanthosoma blandum*. *Journal of Natural Products* 74, 969–975, 2011.
- Lin, X. et al. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1456–1460, 2000.
- Lippa, C.F., et al. Alzheimer's disease and aging: Effects on perforant pathway perikarya and synapses. *Neurobiol Aging* 13, 405–411, 1992.
- Lithfous, S., Dufour, A., and Despres, O. (2013). Spatial navigation in normal aging and the prodromal stage of Alzheimer's disease: insights from imaging and behavioral studies. *Ageing Res Rev*, 12(1), 201-213. doi:10.1016/j.arr.2012.04.007
- Llesuy, S.F., et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori*. 71, 241-249, 1985.
- Lopez, O.L., et al. Long-term effects of the concomitant use of memantine with cholinesterase inhibition in Alzheimer disease. *J. Neurol.* 2009.
- Lowry, O.H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275, 1951.
- Luan, K. et al. Review Viewpoint: Crosstalks between neurofibrillary tangles and amyloid plaque formation. *Ageing Research Reviews* 12, 174– 181, 2013.
- Luchsinger, J.A., et al. Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology* 63, 1187–1192, 2004.
- Machado, R.J.A, et al. Characterization and Pharmacological Properties of a Novel Multifunctional Kunitz Inhibitor from *Erythrina velutina* Seeds. *PLoS ONE* 8, 5, 2013.
- Mahut, H., et al. Hippocampal resections impair associative learning and recognition memory in the monkey. *J Neurosci* 2, 1214–1220, 1982.
- Mandelkow, E.M. & Mandelkow, E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8, 425–427, 1998.

- Mann, D.M., et al. Dopaminergic neurotransmitter systems in Alzheimer's disease and in Down's syndrome at middle age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50, 341–344, 1987.
- Mann, D.M., et al. The progression of the pathological changes of Alzheimer's disease in frontal and temporal neocortex examined both at biopsy and at autopsy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14, 177–195, 1988.
- Marchioro, M., et al. Antinociceptive activity of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. *Fitoterapia* 76, 637–642, 2005.
- Marcinkiewicz, M. & Seidah, N.G. Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem* 75, 2133–2143, 2000.
- Marcyniuk, B., et al. The topography of cell loss from locus caeruleus in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 76, 335–345, 1986.
- Marr, R.A., et al. Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J Neurosci* 23, 1992–1996, 2003.
- Martin, A., et al. On the nature of the verbal memory deficit in Alzheimer's disease. *Brain Lang* 25, 323–341, 1985.
- Masliah, E. & Terry, R. The role of synaptic pathology in the mechanisms of dementia in Alzheimer's disease. *Clin Neurosci* 1, 192–198, 1994.
- Masliah, E. & Terry, R. The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system. *Brain Pathol* 3, 77–85, 1993.
- Masliah, E. et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56, 127–129, 2001.
- Masliah, E. The role of synaptic proteins in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 924, 68–75, 2000.
- Masliah, E., et al. Immunoreactivity of CD45, a protein phosphotyrosine phosphatase, in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 83, 12–20, 1991.
- Masliah, E., et al. Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging. *Neurology* 43, 192–197, 1993.
- Masters, C.L., et al. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 4, 2757–2763, 1985.
- Maguire, E. A., Burgess, N., Donnett, J. G., Frackowiak, R. S., Frith, C. D., & O'Keefe, J. (1998). Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science*, 280(5365), 921-924.
- Malleret, G., Alarcon, J. M., Martel, G., Takizawa, S., Vronskaya, S., Yin, D., . . . Shumyatsky, G. P. (2010). Bidirectional regulation of hippocampal long-term synaptic plasticity and its influence on opposing forms of memory. *J Neurosci*, 30(10), 3813-3825. doi:10.1523/jneurosci.1330-09.2010
- Mankin, E. A., Diehl, G. W., Sparks, F. T., Leutgeb, S., & Leutgeb, J. K. (2015). Hippocampal CA2 activity patterns change over time to a larger extent than between spatial contexts. *Neuron*, 85(1), 190-201. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.001
- Markowska, A. L., Mooney, M., & Sonntag, W. E. (1998). Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits. *Neuroscience*, 87(3), 559-569.
- Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 262(841), 23-81.
- Matsuo, R., Murayama, A., Saitoh, Y., Sakaki, Y., & Inokuchi, K. (2000). Identification and cataloging of genes induced by long-lasting long-term potentiation in awake rats. *J Neurochem*, 74(6), 2239-2249.

Maviel, T., Durkin, T. P., Menzaghi, F., & Bontempi, B. (2004). Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science*, 305(5680), 96-99. doi:10.1126/science.1098180

McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Meltzer, J., & Sutherland, R. J. (1989). Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Exp Brain Res*, 76(3), 485-496.

McNaughton, N., & Morris, R. G. (1987). Chlordiazepoxide, an anxiolytic benzodiazepine, impairs place navigation in rats. *Behav Brain Res*, 24(1), 39-46.

Morris, R. G. (2001). Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356(1413), 1453-1465. doi:10.1098/rstb.2001.0945

Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868), 681-683.

Morris R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat, *J Neurosci Methods*, 11(1):47-60

Morrow, B. A., Elsworth, J. D., Inglis, F. M., & Roth, R. H. (1999). An antisense oligonucleotide reverses the footshock-induced expression of fos in the rat medial prefrontal cortex and the subsequent expression of conditioned fear-induced immobility. *J Neurosci*, 19(13), 5666-5673.

Moser, E., Moser, M. B., & Andersen, P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci*, 13(9), 3916-3925.

Moser, M. B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., & Morris, R. G. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(21), 9697-9701.

Matos, F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. Edições UFC, Fortaleza, 42–53, 1997.

Maurice, T., et al. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res*. 15, 181-193, 1996.

Mawuenyega, K.G., et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330, 1774, 2010.

Mazzitelli, S., et al. The loss of c-Jun Nterminal protein kinase activity prevents the amyloidogenic cleavage of amyloid precursor protein and the formation of amyloid plaques in vivo. *J. Neurosci*. 31, 16969–16976, 2011.

McDonald, J.M., et al. The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Ab dimmers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain* 133, 1328–1341, 2010.

McDonald, M. P., et al. Effects of exogenous β -amyloid peptide on retention for spatial learning. *Behav Neural Biol* 62, 60-67, 1994.

McGeer, P.L., et al. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis* 9, 271–276, 2006.

McKee, A.C. et al. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 709–735, 2009.

McKee, T.C., et al. Isolation and characterization of new anti-HIV and cytotoxic leads from plants, marine, and microbial organisms. *Journal of Natural Products*, 60, 431-438, 1997.

- Mega, M.S., et al. The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology*, 46, 130–135, 1996.
- Megirian, D., et al. The action of some derivatives of beta-erythroidine on peripheral neuro-effector system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 113, 212, 1995.
- Meilandt, W.J., et al. Enkephalin elevations contribute to neuronal and behavioral impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 28, 5007–5017, 2008.
- Miller, B.C., et al. Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulysin activity levels in vivo. *Neurology* 60, 1495–1500, 2003.
- Misra, H.P. & Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 25, 3170-3175, 1972.
- Mizuguchi, M. et al. Differential distribution of cellular forms of β -amyloid precursor protein in murine glial cell cultures. *Brain Res.* 84, 219–225, 1992.
- Morishima-Kawashima, M., et al. Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol. Aging* 16, 365–380, 1995.
- Morris, M., et al. The many faces of tau. *Neuron* 70, 410–426, 2011.
- Mucke, L. & Selkoe, D.J. Neurotoxicity of Amyloid β -Protein: Synaptic and Network Dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012.
- Mukherjee, P.K., et al. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 14, 289–300, 2007.
- Maurer, K., Volk, S., & Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet*, 349(9064), 1546-1549. doi:10.1016/s0140-6736(96)10203-8
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., . . . Masters, C. L. (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 46(6), 860-866.
- Minkeviciene, R., Ihalaenen, J., Malm, T., Matilainen, O., Keksa-Goldsteine, V., Goldsteins, G., . . . Tanila, H. (2008). Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic and wild-type mice. *J Neurochem*, 105(3), 584-594. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05147.x
- Miyakawa, T., Yared, E., Pak, J. H., Huang, F. L., Huang, K. P., & Crawley, J. N. (2001). Neurogranin null mutant mice display performance deficits on spatial learning tasks with anxiety related components. *Hippocampus*, 11(6), 763-775. doi:10.1002/hipo.1092
- Majinda RRT, et al. Bioactive non-alkaloidal constituents from the genus *Erythrina*. *Stud Natural Prod Chem.* 32(12): 821-853, 2005.
- Mc Donald JM, et al. The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain.* 133: 1328–41, 2010.
- McDonald, M.P et al. Effects of an exogenous β -amyloid peptide on retention for spatial learning. *Behavioral and Neural Biology.* 62; 60-67, 1994.
- Mori E, et al. (2006) What constitutes clinical evidence for neuroprotection in Alzheimer disease: Support for the cholinesterase inhibitors? *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 20, 19-S26.

Morris R. An attempt to dissociate spatial-mapping and working-memory theories of hippocampal function. In *The neurobiology of the hippocampus* (ed. Siefert W). Academic Press, London; 1983. pp. 405–432.

Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 11:47–60, 1984 doi: 10.1016/0165-0270(84)90007-4.

McDonald, R. J., and White, N. M. (1993). A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci*, 107(1), 3-22.

McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Meltzer, J., and Sutherland, R. J. (1989). Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Exp Brain Res*, 76(3), 485-496.

McNaughton B.L., Morris R.G.M. (1987). Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory systems. *Trends Neurosci*. 10: 408–415.

Moffat, S. D., Elkins, W., and Resnick, S. M. (2006). Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation. *Neurobiol Aging*, 27(7), 965-972. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.011

Moffat, S. D., Zonderman, A. B., and Resnick, S. M. (2001). Age differences in spatial memory in a virtual environment navigation task. *Neurobiol Aging*, 22(5), 787-796.

Morzelle, M.C., Salgado, J.M., Telles, M., Mourelle, D., Bachiega, P., Buck, H.S., et al. (2016). Neuroprotective Effects of Pomegranate Peel Extract after Chronic Infusion with Amyloid-beta Peptide in Mice. *PLoS One* 11(11), e0166123. doi: 10.1371/journal.pone.0166123.

Nadel, L., & MacDonald, L. (1980). Hippocampus: cognitive map or working memory? *Behav Neural Biol*, 29(3), 405-409.

Nitta, A., Itoh, A., Hasegawa, T., and Nabeshima, T. (1994). beta-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett*, 170(1), 63-66.

Nabeshima, T. & Nitta, A. Memory impairment and neuronal dysfunction induced by β -amyloid protein in rats. *Tohoku J Exp Med* 174, 241-249, 1994.

Nabeshima, T., & Itoh, A. Toxicity of β -amyloid protein: neurochemical, histological and behavioral changes. In K. Iqbal, B. Winblad, T. Nishimura, M. Takeda, & H. M. Wisniewski (Eds.), *Alzheimer's Disease: Biology, Diagnosis and Therapeutics*, Chichester Wiley, 623-630, 1997a.

Nabeshima, T., & Itoh, A. Alzheimer's disease animal models induced by continuous infusion of β -amyloid protein and anti-nerve growth factor antibody. *Rev Heteroatom Chem* 16, 229-255, 1997b.

Nakajima, S., et al. Potato extract (Potein) suppresses food intake in rats through inhibition of luminal trypsin activity and direct stimulation of cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 9491–9496, 2011.

Nakamura, S., et al. Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta -amyloid peptide 1–42. *Brain Research* 912, 128–136, 2001.

- Nelson, P.T., et al. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 1–14, 2009.
- Netland, E. E., et al. Indomethacin reverses the microglial response to amyloid β -protein. *Neurobiol Aging* 19, 201–204, 1998.
- Newell, K. L. et al. Application of the National Institute on Aging (NIA)-Reagan Institute criteria for the neuropathological diagnosis of Alzheimer disease, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58, 1147–1155, 1999.
- Nishiyama, T., et al. Effects of a protease inhibitor, ulinastatin, on coagulation and fibrinolysis in abdominal surgery. *Journal of Anesthesia* 20, 179–182, 2006.
- Nitsch, R.M., et al. Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1671–1675, 1992.
- Nitta, A., et al. β -Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett* 170, 63–66, 1994a.
- Nitta, A., et al. Continuous infusion of β -amyloid protein into cerebral ventricle induces learning impairment and neuronal and morphological degeneration. *Jpn J Pharmacol* 73, 51–57, 1997.
- Nunomura, A., et al. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 631–641, 2006.
- Navratilova, Z., & Battaglia, F. P. (2015). CA2: it's about time-and episodes. *Neuron*, 85(1), 8–10. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.044
- Oka, J.-I., et al. Endogenous GLP-1 modulates hippocampal activity in β -amyloid protein-treated rats. *Neuroreport* 10, 2961–2964, 1999.
- O'Keefe & Nadal. *The Hippocampus as a cognitive map*. Oxford University Press. 1978.
- Olariu, A., et al. Alterations of nicotinic cholinergic receptor binding induced by beta-amyloid (1–42) in rats. *Soc Neurosci Abstr* 25, 2118, 1999.
- Oliveira, J.T.A., et al. Protein and lectin mobilization during germination of *Erythrina velutina* forma aurantiaca seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 10, 25–30, 1998.
- Onusic, G.M., et al. Effect of acute treatment with a water–alcohol extract of *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35, 473–477, 2002.
- Onusic, G.M., et al. Effects of chronic treatment with a water-alcohol extract from *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. *Biol Pharm Bull* 26, 1538–1542, 2003.
- Orhan, I., et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 91, 57–60, 2004.
- Orhan, I., et al. Sustainable use of various Amaryllidaceae plants against Alzheimer's disease. *Proc. WOCMAP III. Targeted Screening of MAPs, Economics and Law.* Acta Hort 678, ISHS, 4, 2005.
- Ozawa M, Etoh T, Hayashi M, Komiyama K, Kishida A, Ohsaki A. TRAIL-enhancing activity of Erythrinan alkaloids from *Erythrina velutina*. *Bioorg Med Chem Lett*;19:234–236, 2009.
- Olton, D. S. (1979). Mazes, maps, and memory. *Am Psychol*, 34(7), 583–596.
- Oddo, S. et al. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Ab and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.

O'Leary, T. P., & Brown, R. E. (2009). Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*, 201(1), 120-127. doi:10.1016/j.bbr.2009.01.039

O'Leary, T. P., & Brown, R. E. (2012). The effects of apparatus design and test procedure on learning and memory performance of C57BL/6J mice on the Barnes maze. *J Neurosci Methods*, 203(2), 315-324. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.09.027

O'Reilly, R. C., & McClelland, J. L. (1994). Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus*, 4(6), 661-682. doi:10.1002/hipo.450040605

O'Leary, T. P., and Brown, R. E. (2009). Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*, 201(1), 120-127. doi:10.1016/j.bbr.2009.01.039

O'Leary, T. P., and Brown, R. E. (2012). The effects of apparatus design and test procedure on learning and memory performance of C57BL/6J mice on the Barnes maze. *J Neurosci Methods*, 203(2), 315-324. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.09.027

Palop, J. J., Chin, J., Bien-Ly, N., Massaro, C., Yeung, B. Z., Yu, G. Q., and Mucke, L. (2005). Vulnerability of dentate granule cells to disruption of arc expression in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci*, 25(42), 9686-9693. doi:10.1523/jneurosci.2829-05.2005

Palop, J. J., Chin, J., Roberson, E. D., Wang, J., Thwin, M. T., Bien-Ly, N., Mucke, L. (2007). Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron*, 55(5), 697-711. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.025

Palop, J. J., Jones, B., Kekoni, L., Chin, J., Yu, G. Q., Raber, J., Mucke, L. (2003). Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16), 9572-9577. doi:10.1073/pnas.1133381100

Paxinos, G. and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edn.Oxford:Elsevier.

Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., and Cotman, C. W. (1991). In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res*, 563(1-2), 311-314.

Plancher, G., Gyselinck, V., Nicolas, S., and Piolino, P. (2010). Age effect on components of episodic memory and feature binding: A virtual reality study. *Neuropsychology*, 24(3), 379-390. doi:10.1037/a0018680

Pompl, P. N., Mullan, M. J., Bjugstad, K., and Arendash, G. W. (1999). Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: use in detecting cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci Methods*, 87(1), 87-95.

Poucet, B., Herrmann, T., and Buhot, M. C. (1991). Effects of short-lasting inactivations of the ventral hippocampus and medial septum on long-term and short-term acquisition of spatial information in rats. *Behav Brain Res*, 44(1), 53-65.

Pouzet, B., Zhang, W. N., Feldon, J., and Rawlins, J. N. (2002). Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies. *Behav Brain Res*, 133(2), 279-291.

Prut, L., Abramowski, D., Krucker, T., Levy, C. L., Roberts, A. J., Staufenbiel, M., and Wiessner, C. (2007). Aged APP23 mice show a delay in switching to the use of a strategy in the Barnes maze. *Behav Brain Res*, 179(1), 107-110. doi:10.1016/j.bbr.2007.01.017

Palop, J.J. & Mucke, L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.* 13, 812–818, 2010.

Palop, J.J. & Mucke, L. Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 66, 435–440, 2009.

Palop, J.J., et al. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55, 697–711, 2007.

Palop, J.J., et al. Quantifying biomarkers of cognitive dysfunction and neuronal network hyperexcitability in mouse models of Alzheimer's disease: Depletion of calcium-dependent proteins and inhibitory hippocampal remodeling. *Methods Mol Biol*, 2011.

Pan, S. Y. Features of memory on novel situation and avoidance response: evidence from comparisons between open-field behavior and step-through task. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 2, 125-129, 1995.

Pearson, R.C., et al. Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4531–4534, 1985.

Pepeu, G., et al. Amyloid β -peptides injection into the cholinergic nuclei: morphological, neurochemical and behavioral effects. *Prog Brain Res* 109, 273-282, 1996.

Perez, M., et al. Interaction of Alzheimer's disease amyloid β peptide fragment 25–35 with tau protein, and with a tau peptide containing the microtubule binding domain. *Journal of Alzheimer's Disease* 6, 461–467, 2004.

Perlson, E. et al. Retrograde axonal transport: Pathways to cell death? *Trends Neurosci* 33, 335–344, 2010.

Perry, G. et al. Immunocytochemical properties of Alzheimer straight filaments. *J Neurosci* 7, 3736–3738, 1987.

Perry, G., et al. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radic Biol Med* 33,1475–1479, 2002.

Perry, N.S., et al. *In vitro* activities of *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol.* 53, 1347–1356, 2001.

Perry, N.S., et al. *In vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J Pharm Pharmacol.* 52, 895–902, 2002.

Pham, E., et al. Progressive accumulation of amyloid- β oligomers in Alzheimer's disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *FEBS J* 277, 3051–3067, 2010.

Philipson, O., et al. A highly insoluble state of Ab similar to that of Alzheimer's disease brain is found in Arctic APP transgenic mice. *Neurobiol Aging* 30, 1393–1405, 2009.

Praprotnik, D., et al. Filament heterogeneity within the dystrophic neurites of senile plaques suggests blockage of fast axonal transport in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 91, 226–235, 1996.

Pasternack, J. M., Palmert, M. R., Usiak, M., Wang, R., Zurcher-Neely, H., Gonzalez-De Whitt, P. A., . . . et al. (1992). Alzheimer's disease and control brain contain soluble derivatives of the amyloid protein precursor that end within the beta amyloid protein region. *Biochemistry*, 31(44), 10936-10940.

Paylor, R., Zhao, Y., Libbey, M., Westphal, H., & Crawley, J. N. (2001). Learning impairments and motor dysfunctions in adult Lhx5-deficient mice displaying hippocampal disorganization. *Physiol Behav*, 73(5), 781-792.

Pompl, P. N., Mullan, M. J., Bjugstad, K., & Arendash, G. W. (1999). Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: use in detecting cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci Methods*, 87(1), 87-95.

Park, D. C., Puglisi, J. T., & Lutz, R. (1982). Spatial memory in older adults: effects of intentionality. *J Gerontol*, 37(3), 330-335.

Park, D. C., Puglisi, J. T., & Sovacool, M. (1983). Memory for pictures, words, and spatial location in older adults: evidence for pictorial superiority. *J Gerontol*, 38(5), 582-588.

Perry EK, et al (1977). Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* 1, 189.

Possin, V. Visual Spatial Cognition in Neurodegenerative Disease. *Neurocase*. 16(6): 466–48, 2010. doi:10.1080/13554791003730600

Qiu, W.Q. & Folstein, M.F. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging* 27, 190–198, 2006.

Qiu, W.Q., et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 273, 32730–32738, 1998.

Querfurth, H.W., & LaFerla, F.M. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344, 2010.

Reiserer, R. S., Harrison, F. E., Syverud, D. C., & McDonald, M. P. (2007). Impaired spatial learning in the APPSwe + PSEN1DeltaE9 bigenic mouse model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav*, 6(1), 54-65. doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00221.x

Rojanathammanee, L., Puig, K. L., & Combs, C. K. (2013). Pomegranate polyphenols and extract inhibit nuclear factor of activated T-cell activity and microglial activation in vitro and in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Nutr*, 143(5), 597-605. doi:10.3945/jn.112.169516

Raskind, M.A., et al. Galantamine in AD: a 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. The Galantamine USA-1 Study Group. *Neurology* 54, 2261–2268, 2000.

Rodriguez, G. A., Burns, M. P., Weeber, E. J., and Rebeck, G. W. (2013). Young APOE4 targeted replacement mice exhibit poor spatial learning and memory, with reduced dendritic spine density in the medial entorhinal cortex. *Learn Mem*, 20(5), 256-266. doi:10.1101/lm.030031.112

Rojanathammanee, L., Puig, K. L., and Combs, C. K. (2013). Pomegranate polyphenols and extract inhibit nuclear factor of activated T-cell activity and microglial activation in vitro and in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Nutr*, 143(5), 597-605. doi:10.3945/jn.112.169516

Raupp, I.M., et al. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. *J Ethnopharmacol* 118, 295-299, 2008.

Renner, M., et al. Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66, 739-754, 2010.

Riaz, N., et al. Cholinesterase inhibiting withanolides from *Ajuga brateosa*. *Chem Biodivers*. 1, 1289-1295, 2004.

Ribeiro, M.D., et al. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39, 263-270, 2006.

Rogers, J. et al. Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: Relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 9, 339-349, 1988.

Röncke, R., et al. Early neuronal dysfunction by amyloid β oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol. Aging* 32, 2219-2228, 2011.

Rosendorff, C., et al. Cardiovascular risk factors for Alzheimer's disease. *Am. J. Geriatr. Cardiol.* 16, 143-149, 2007.

Roth, G.S., et al. Membrane alterations as causes of impaired signal transduction in Alzheimer's disease and aging. *Trends Neurosci* 18, 203-206, 1995.

Roy, F. et al. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International* 43, 432-442, 2010.

Reiman EM, Langbaum JBS, Fleisher AS, Caselli RJ, Chen K, Ayutyanont N, Quiroz YT, Kosik KS, Lopera F, Tariot PN. Alzheimer's Prevention Initiative: a plan to accelerate the evaluation of presymptomatic treatments. *J Alzheimers Dis.* 25:293-301, 2011.

Reiman EM, Langbaum JBS, Tariot PN. Alzheimer's Prevention Initiative: a proposal to evaluate presymptomatic treatments as quickly as possible. *Biomarkers in Medicine*. 2010; 4:3-14. PubMed: 20383319.

Reiman, EM.; Langbaum, JBS. Brain imaging in the evaluation of putative Alzheimer's disease slowing, risk-reducing and prevention therapies.. In: Jagust, WJ.; D'Esposito, M., editors. *Imaging the Aging Brain*. Oxford University Press; New York: 2009. p. 319-350.

Resnick, S. M., Sojkova, J., Zhou, Y., An, Y., Ye, W., Holt, D. P., . . . Wong, D. F. (2010). Longitudinal cognitive decline is associated with fibrillar amyloid-beta measured by [11C]PiB. *Neurology*, 74(10), 807-815. doi:10.1212/WNL.0b013e3181d3e3e9

Rodriguez GA, et al. (2013) Young APOE4 targeted replacement mice exhibit poor spatial learning and memory, with reduced dendritic spine density in the medial entorhinal cortex. *Learning & memory*. 20: 256-266.

Sanchez-Mejia, R.O., et al. Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 11, 1311-1318, 2008.

Santos, W. P. In vitro and ex vivo anticholinesterase activities of *Erythrina velutina* leaf extracts. *Pharmaceutical Biology* 50, 919-924, 2012a.

- Santos, A. E., et al. Affinity Chromatography as a Key Tool to Purify Protein Protease Inhibitors from Plants. In: Magdeldin S, editor. *cdn.intechopen.com*. InTech. 211–244, 2012b.
- Sarasqueta, D.F.O., et al. Efeitos do extrato hidroalcoólico da *Erythrina velutina* Willd sobre os potenciais sinápticos em fatias do hipocampo de ratos. *FESBE Abstracts*: 12.044, 2002.
- Sastre, M. et al. Inflammatory risk factors and pathologies associated with Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 8, 132–141, 2011.
- Small, G.W. et al. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *JAMA* 278,1363–1371, 1997.
- Sharp, E.S. & Gatz, M. Relationship between education and dementia: an updated systematic review. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 25, 2011.
- Sa, F., Pinto, P., Cunha, C., Lemos, R., Letra, L., Simoes, M., and Santana, I. (2012). Differences between Early and Late-Onset Alzheimer's Disease in Neuropsychological Tests. *Front Neurol*, 3, 81. doi:10.3389/fneur.2012.00081
- Sadek, J. R., Johnson, S. A., White, D. A., Salmon, D. P., Taylor, K. I., Delapena, J. H., Grant, I. (2004). Retrograde amnesia in dementia: comparison of HIV-associated dementia, Alzheimer's disease, and Huntington's disease. *Neuropsychology*, 18(4), 692-699. doi:10.1037/0894-4105.18.4.692
- Savonenko, A., Xu, G. M., Melnikova, T., Morton, J. L., Gonzales, V., Wong, M. P., Borchelt, D. R. (2005). Episodic-like memory deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol Dis*, 18(3), 602-617. doi:10.1016/j.nbd.2004.10.022
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., and Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1), a006189. doi:10.1101/cshperspect.a006189
- Skelton, R. W., Bukach, C. M., Lurance, H. E., Thomas, K. G., and Jacobs, J. W. (2000). Humans with traumatic brain injuries show place-learning deficits in computer-generated virtual space. *J Clin Exp Neuropsychol*, 22(2), 157-175. doi:10.1076/1380-3395(200004)22:2;1-1;ft157
- Sunyer B, Patil S, Hoger H, Lubec G. (2007). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Nature protocols*. 390. doi:10.1038/nprot.2007.390.
- Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L., Jr., Eckman, C., Younkin, S. G. (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*, 264(5163), 1336-1340.
- Serrano-Pozo, A., et al. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, 1-23, 2011.
- Sherrington, R. et al., Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375, 754–760, 1995.

- Selkoe, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6, 487–498, 1991.
- Saunders, A.J., et al. BACE maps to chromosome 11 and a BACE homolog, BACE2, reside in the obligate Down syndrome region of chromosome 21. *Science* 286, 1255, 1999.
- Scheff, S.W. & Price, D.A. Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 33, 190–199, 1993.
- Scheff, S.W., et al. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 27, 1372–1384, 2006.
- Scheff, S.W., et al. Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 11, 29–37, 1990.
- Scheff, S.W., et al. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68, 1501–1508, 2007.
- Scheuner, D., et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med* 2, 864–870, 1996.
- Schmidt, A., et al. Comparison of Alzheimer Ab(1–40) and Ab(1–42) amyloid fibrils reveals similar protofilament structures. *PNAS* 106, 19813–19818, 2009.
- Selkoe, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6, 487–498, 1991.
- Selkoe, D.J. Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011.
- Selkoe, D.J. Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192, 106–113, 2008.
- Selkoe, D.J., et al. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7341–7345, 1988.
- Serrano-Pozo, A., et al. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, 1–23, 2011.
- Shankar, G.M., et al. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14, 837–842, 2008.
- Shankar, G.M., et al. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- β protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27, 2866–2875, 2007.
- Sharp, E.S. & Gatz, M. Relationship between education and dementia: an updated systematic review. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 25, 2011.
- Sheng, Z.H. & Cai, Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 77–93, 2012.
- Smith, M.A. & Perry, G. The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 217, 1997.
- Smith, M.A. Alzheimer disease. *Int Rev Neurobiol* 42, 1–54, 1998.
- Snyder, E.M., et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nat Neurosci* 8, 1051–1058, 2005.
- Sperling, R.A., et al. Functional alterations in memory networks in early Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 12, 27–43, 2010.
- Struble, R.G., et al. Senile plaques in cortex of aged normal monkeys. *Brain Res* 361, 267–275, 1985.
- Supnet, C. & Bezprozvanny, I. The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. *Cell Calcium* 47, 183–189, 2010.

- Susanne, P.J., et al. The toxicity of tau in Alzheimer disease: turnover, targets and potential therapeutics. *J. Cell Mol. Med.* 20, 1–15, 2011.
- Suzuki, K. & Terry, R.D. Fine structural localization of acid phosphatase in senile plaques in Alzheimer's presenile dementia. *Acta Neuropathol* 8, 276–284, 1967.
- Suzuki, N., et al. An increased percentage of long amyloid β protein is secreted by familial amyloid β protein precursor (β APP717) mutants. *Science* 264, 1336–1340, 1994.
- Sweeney, W. A., et al. Intrahippocampal β -amyloid impairs win-shift radial maze performance in rats. *Neurobiol Learn Mem* 68, 97–101, 1997.
- Schmidt, B., Satvat, E., Argraves, M., Markus, E. J., & Marrone, D. F. (2012). Cognitive demands induce selective hippocampal reorganization: Arc expression in a place and response task. *Hippocampus*, 22(11), 2114–2126. doi:10.1002/hipo.22031
- Seeger, T., Fedorova, I., Zheng, F., Miyakawa, T., Koustova, E., Gomez, J., . . . Wess, J. (2004). M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. *J Neurosci*, 24(45), 10117–10127. doi:10.1523/jneurosci.3581-04.2004
- Smith, D. M., & Mizumori, S. J. (2006). Learning-related development of context-specific neuronal responses to places and events: the hippocampal role in context processing. *J Neurosci*, 26(12), 3154–3163. doi:10.1523/jneurosci.3234-05.2006
- Spencer JPE. The impact of flavonoids on memory, physiological and molecular considerations. *Chem Soc Rev* 2009, 38:1152–1161.
- Subash S, et al. Long-term (15 mo) dietary supplementation with pomegranates from Oman attenuates cognitive and behavioral deficits in a transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Nutr.* 2015; 31:223–229.
- Sugino, K., Hempel, C. M., Miller, M. N., Hattox, A. M., Shapiro, P., Wu, C., . . . Nelson, S. B. (2006). Molecular taxonomy of major neuronal classes in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*, 9(1), 99–107. doi:10.1038/nn1618
- Suzuki, W. A., & Eichenbaum, H. (2000). The neurophysiology of memory. *Ann N Y Acad Sci*, 911, 175–191.
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20(1), 11–21.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 81(2), 741–766. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.741
- Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., . . . Phelps, C. H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 7(3), 280–292. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.003
- Squire, L. R., Stark, C. E., & Clark, R. E. (2004). The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci*, 27, 279–306. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130
- Storandt, M., Mintun, M. A., Head, D., & Morris, J. C. (2009). Cognitive decline and brain volume loss as signatures of cerebral amyloid-beta peptide deposition identified with Pittsburgh compound B: cognitive decline associated with Abeta deposition. *Arch Neurol*, 66(12), 1476–1481. doi:10.1001/archneurol.2009.272
- Stouffer, E. M., & Heisey, J. L. (2013). Latent learning of spatial information is impaired in middle-aged rats. *Dev Psychobiol*, 55(3), 309–315. doi:10.1002/dev.21021
- Suzuki, K., & Terry, R. D. (1967). Fine structural localization of acid phosphatase in senile plaques in Alzheimer's presenile dementia. *Acta Neuropathol*, 8(3), 276–284.

- Schimanski, L.A. et al. Tracking the course of hippocampal representations during learning: When is the map required? *J Neurosci*. Feb 13; 33(7): 3094–3106, 2013. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1348-12.2013
- Struble RG, et al. (1982). Cholinergic innervation in neuritic plaques. *Science* 216, 413-415. Tran, T.T, et al. (2011). Chronic psychosocial stress enhances long-term depression in a subthreshold amyloid-beta rat model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 119(2), 408-416. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07437.x.
- Tanila, H. (1999). Hippocampal place cells can develop distinct representations of two visually identical environments. *Hippocampus*, 9(3), 235-246. doi:10.1002/(sici)1098-1063(1999)9:3<235::aid-hipo4>3.0.co;2-3
- Taniura, H., Sng, J. C. G., & Yoneda, Y. (2007). Histone modifications in the brain. *Neurochemistry International*, 51(2), 85-91. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.04.018
- Tashiro, A., Makino, H., & Gage, F. H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci*, 27(12), 3252-3259. doi:10.1523/jneurosci.4941-06.2007
- Teixeira, C. M., Pomedli, S. R., Maei, H. R., Kee, N., & Frankland, P. W. (2006). Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J Neurosci*, 26(29), 7555-7564. doi:10.1523/jneurosci.1068-06.2006
- Tischmeyer, W., & Grimm, R. (1999). Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci*, 55(4), 564-574. doi:10.1007/s000180050315
- Treves, A., & Rolls, E. T. (1994). Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus*, 4(3), 374-391. doi:10.1002/hipo.450040319
- Tackenberg, C. & Brandt, R. Divergent pathways mediate spine alterations and cell death induced by amyloid- β wildtype tau, and R406W tau. *J Neurosci* 29, 14439–14450, 2009.
- Takeda, S., et al. Validation of A β 1–40 administration into mouse cerebroventricles as an animal model for Alzheimer disease. *Brain Research* 1280 , 137 – 147, 2009.
- Tanzi, R.E. The synaptic Abeta hypothesis of Alzheimer disease. *Nat Neurosci* 8, 977–979, 2005.
- Tanzi, R.E., et al. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331, 528–530, 1988.
- Tariot, P.N., et al. A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. The Galantamine USA-10 Study Group. *Neurology* 54, 2269–2276, 2000.
- Teipel, S.J., et al. Measurement of basal forebrain atrophy in Alzheimer's disease using MRI. *Brain* 128, 2626–2644, 2005.
- Telikapalli, H., et al. Isoflavonoids and a cinnamyl phenol from root extracts of *Erythrina variegat*. *Phytochemistry* 29, 2005–2007, 1990.
- Terry, R., et al. Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 10, 184–192, 1981.
- Terry, R., et al. Structural basis of the cognitive alterations in Alzheimer disease. In *Alzheimer disease* (ed. R. Terry, R. Katzman), pp. 179–196, 1994. Raven, New York.
- Terry, R.D., et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30, 572–580, 1991.

Teske, M. & Trentini, A.M.M. Herbarium: Conpêndio de Fitoterapia, Herbarium Laboratório Botânico, Curitiba, Brazil, 1995

Tarawneh, R., and Holtzman, D. M. (2012). The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(5), a006148. doi:10.1101/cshperspect.a006148.

Tran, T.T., Srivareerat, M., Alhaider, I.A., and Alkadhi, K.A. (2011). Chronic psychosocial stress enhances long-term depression in a subthreshold amyloid-beta rat model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 119(2), 408-416. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07437.x.

Tomiyama, T., et al. A mouse model of amyloid β oligomers: Their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo. *J Neurosci* 30, 4845–4856, 2010.

Townsend, M., et al. Effects of secreted oligomers of amyloid β -protein on hippocampal synaptic plasticity: A potent role for trimers. *J Physiol* 572, 477–492, 2006.

Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M. Fatal attractions of proteins. A comprehensive hypothetical mechanism underlying Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Ann NY Acad Sci* 924, 62–67, 2000.

Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M. Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB J*, 9, 1570–1576, 1995.

Urani, A., et al. Enhanced antidepressant efficacy of sigma1 receptor agonists in rats after chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid-(1-40) protein. *Eur J Pharmacol*. 20, 151-161, 2004.

Van Dam, D. & De Deyn, P.P. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat. Rev. Drug Discov*. 5, 956–970, 2006.

Van Den Heuvel, C. et al. Traumatic brain injury and Alzheimer's disease: a review. *Prog. Brain Res*. 161, 303–316, 2007.

VanMarum, R. J. Current and future therapy in Alzheimer's disease, *Fundamental and Clinical Pharmacology* 22, 265–274, 2008.

Vasconcelos, S.M., et al. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. *J Pharm Pharmacol* 56, 389-393, 2004.

Vassar, R., et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741, 1999.

Vekrellis, K., et al. Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci* 20, 1657–1665, 2000.

Verret, L., et al. Key role of interneuronal impairments in Alzheimer's disease-related neural network and cognitive dysfunction. *Cell* 149, 2012.

Vianna, M.R.M., et al. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34, 233–240, 2001.

Villeda, S.A., et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477, 90–94, 2011.

Vorhees, C.V.; Williams, M.T. (2014). Assessing Spatial Learning and Memory in Rodents. *ILAR Journal*. 55, 2, doi: 10.1093/ilar/ilu013.

Walker JM, Fowler SW, Miller DK, Sun AY, Weisman GA, et al. (2011) Spatial learning and memory impairment and increased locomotion in a transgenic amyloid

precursor protein mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural brain research* 222: 169–175.

Whishaw IQ. A comparison of rats and mice in a swimming pool place task and matching to place task: some surprising differences. *Physiol Behav.* 58:687–693, 1995. doi: 10.1016/0031-9384(95)00110-5.

Whitehouse PJ, (1981) Alzheimer disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol* 10, 122-126.

West, R., Murphy, K. J., Armilio, M. L., Craik, F. I., & Stuss, D. T. (2002). Lapses of intention and performance variability reveal age-related increases in fluctuations of executive control. *Brain Cogn*, 49(3), 402-419.

Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313(5790), 1093-1097. doi:10.1126/science.1128134

Walsh, D., et al. Naturally secreted oligomers of the Alzheimer amyloid β -protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539, 2002.

Walsh, D.M. & Selkoe, D.J. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101, 1172–1184, 2007.

Walsh, D.M. & Selkoe, D.J. Oligomers on the brain: The emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett* 11, 213–228, 2004.

Walsh, D.M., et al. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539, 2002.

Wang, Q., et al. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid β -peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and pp38 mitogenactivated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci* 24, 3370–3378, 2004.

Wang, R., et al. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacol Sin*, 27, 1–26, 2006.

Webster, N.R. & Nunn, J.F. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br J Anaesth.* 60, 98-108, 1988.

Weingartner, H., et al. Forms of memory failure. *Science* 221, 380–382, 1983.

Weinmann, S., et al. Effects of Ginkgo biloba in dementia: Systematic review and metaanalysis. *BMC Geriatr*, 10, 14, 2010.

Weldon, D., et al. Fibrillar β -amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a selected population of neurons in rat CNS in vivo. *J Neurosci* 18, 2161- 2173, 1998.

Wendel, A., et al. A novel biologically active seleno-organic compound--II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. *Biochem Pharmacol.* 15, 3241-3245, 1984.

Wertkin, A.M., et al. Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular β -amyloid or A4 peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 9513–9517, 1993.

West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., and Troncoso, J. C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*, 344(8925), 769-772.

Wilcock, G.K. & Esiri, M.M. Plaques, tangles and dementia. A quantitative study. *J Neurol Sci* 56, 343–356, 1982.

Wilcock, G.K., et al. Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. Galantamine International-1 Study Group. *BMJ* 321, 1445–1449, 2000.

Winkler, J., et al. Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. *J Mol Med* 76, 555–567, 1998.

Winner, B., et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 4194–4199, 2011.

Winters, B. D., & Bussey, T. J. Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *Journal of Neuroscience* 25, 52–61, 2005.

Whishaw, I. Q., Hines, D. J., & Wallace, D. G. (2001). Dead reckoning (path integration) requires the hippocampal formation: evidence from spontaneous exploration and spatial learning tasks in light (allothetic) and dark (idiothetic) tests. *Behav Brain Res*, 127(1-2), 49-69.

Wintzer, M. E., Boehringer, R., Polygalov, D., & McHugh, T. J. (2014). The hippocampal CA2 ensemble is sensitive to contextual change. *J Neurosci*, 34(8), 3056-3066. doi:10.1523/jneurosci.2563-13.2014

Wisden, W., Errington, M. L., Williams, S., Dunnett, S. B., Waters, C., Hitchcock, D., Hunt, S. P. (1990). Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. *Neuron*, 4(4), 603-614.

Yamada, K. & Nabeshima, T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 88, 93-113, 2000.

Yamada, K., et al. Changes in ciliary neurotrophic factor content in the rat brain after continuous intracerebroventricular infusion of β -amyloid (1- 40) protein. *Neurosci Lett* 201, 155-158, 1995.

Yamada, K., et al. Perspectives of pharmacotherapy in Alzheimer's disease. *Jpn J Pharmacol* 80, 9- 14, 1999a.

Yamada, K., et al. Protective effects of idebenone and α -tocopherol on β -amyloid (1- 42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in β -amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *European J Neurosci* 11, 83-90, 1999b.

Yamada, K., et al. Improvement by nefiracetam of β -amyloid (1- 42)- induced learning and memory impairments in rats. *Br J Pharmacol* 126, 235- 244, 1999c.

Yamada, T., et al. Structure and expression of the alternatively spliced forms of mRNA for the mouse homolog of Alzheimer's disease amyloid beta protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 158, 906–912, 1989.

Yamamoto Y, et al. Ginkgo biloba extract improves spatial memory in rats mainly but not exclusively via a histaminergic mechanism. *Brain Res* 2007, 1129(1):161–165.

Yan, R., et al. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533–537, 1999.

Yan, R., et al. The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta-amyloid precursor protein (APP) substrate. *J. Biol. Chem.* 276, 36788–36796, 2001.

Yang, L.B., et al. Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med* 9, 3–4, 2003.

Zempel, H., et al. Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J. Neurosci.* 30, 11938–11950, 2010.

Zheng, H. & Koo, E.H. The amyloid precursor protein: Beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1, 5, 2006.

Zhongtao, Z. et al. Sequence-specific recognition of the internalization motif of the Alzheimer's amyloid precursor protein by the X11 PTB domain. *J. EMBO* 16, 6141–6150, 1997.

Zola-Morgan, S., et al. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6, 2950–2967, 1986.

Zheng, H. & Koo, E.H. The amyloid precursor protein: Beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1, 5, 2006.

Zhu, C.W. & Sano, M. Economic considerations in the management of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 1, 143–154, 2006.



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PROTOCOLO N.º 050/2014 (2)

Professor/Pesquisador: *REGINA HELENA DA SILVA*

Natal (RN), 01 de dezembro de 2014. Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que o projeto “AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Erythrina velutina* EM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER”, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a **elaboração de relatório que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída.**

Relatório: **ABRIL 2016.**

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,



John Fontenele Araujo

Coordenador da CEUA

ANEXO II

(Artigo aceito pelo periódico *Frontiers in Aging Neuroscience*)

Subtle alterations in spatial memory induced by amyloid peptides infusion in rats

Priscila Tavares Macêdo^{1,2}, Antônio Carlos Queiroz de Aquino¹, Ywlliane da Silva Rodrigues Meurer^{1,3}, Luiz Eduardo Mateus Brandão¹; Clarissa Loureiro Chagas Campêlo¹, Ramon Hypólito Lima¹, Marcos Romualdo Costa², Alessandra Mussi Ribeiro⁴, Regina Helena Silva^{3,*}.

¹Memory Studies Laboratory, Physiology Department, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil;

²Brain Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil;

³Behavioral Neuroscience Laboratory, Pharmacology Department, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil;

⁴Laboratory of Neuroscience and Bioprospecting of Natural Products, Department of Biosciences, Universidade Federal de São Paulo, Santos, Brazil.

***Correspondence:**

Departamento de Farmacologia – Escola Paulista de Medicina/UNIFESP

Rua Botucatu, 862 – Edifício Leal Prado

CEP 04023062, São Paulo, SP, Brazil

E-mail: reginahsilva@gmail.com

Keywords: Neurodegenerative disease, β -Amyloid peptide, Barnes maze, navigation, strategy.

Running title: Spatial and non-spatial strategies after amyloid peptide infusion

Abstract

The cause of Alzheimer's disease (AD) remains uncertain. The accumulation of amyloid peptides (A β) is the main pathophysiological hallmark of the disease. Spatial deficit is an important initial sign of AD, while other types of memory impairments that appear in later stages. The Barnes maze allows the detection of subtle alterations in spatial search by the analysis of use of different strategies. Previous findings showed a general performance deficit in this task following long-term (35 days) infusion of A β , which corresponds to the moderate or severe impairments of the disease. In the present study, we evaluated the effects of a low-dose 15-day long treatment with A β peptides on spatial and non-spatial strategies of rats tested in the Barnes maze. A β peptides (0.5 μ L/site/day; 30pmol solution of A β 1-40:A β 1-42 10:1) or saline were bilaterally infused into the CA1 (on the first treatment day) and intraventricularly (on the following 15 days) in six-month-old Wistar male rats. A β infusion induced a deficit in the performance (increased latency and distance traveled to reach the target compared to saline group). In addition, a significant association between treatment and search strategy in the retrieval trial was found: A β group preferred the non-spatial search strategy, while saline group preferred the spatial search. In conclusion, the protocol of A β infusion used here induced a subtle cognitive deficit that was specific to spatial aspects. Indeed, animals under A β treatment still showed retrieval, but using non-spatial strategies. We suggest that this approach is potentially useful to the study of the initial memory deficits in early AD.

1 Introduction

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by atypical neural activity, dysfunction and loss of synapses and neurons, accompanied by progressive cognitive decline (Braak et al., 1992; West et al., 1994; Eustache et al., 2004; (Sadek et al., 2004). The main pathophysiological hallmarks of AD are amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the brain tissue (Serrano-Pozo et al., 2011). The exact cause of AD remains unknown, although the accumulation of amyloid peptides has been suggested as the cause of cytotoxicity. This accumulation is the basis of the amyloid cascade hypothesis for AD and precedes the first manifestations of cognitive decline (Braak & Braak, 1991a); (Hardy & Selkoe, 2002); Desikan et al., 2012; Sperling et al., 2011; 2014).

Recent studies have investigated human spatial learning and memory in virtual reality environments (Iaria et al., 2009; Head and Isom, 2010; Plancher et al., 2010). This approach has been useful to show age-related cognitive hippocampal dysfunctions, similarly to studies in rodent models (McNaughton et al., 1989; Poucet et al., 1991; Pouzet et al., 2002; McDonald and White, 1993). The results highlight the importance of protocols for early detection of such impairment (Foster et al., 2012). Further, spatial deficits detected in navigation tasks have been proposed as an important initial sign of AD, and this feature distinguishes this condition from other types of age-related cognitive impairments (Lithfous et al., 2013). In addition, deficits in other types of memory usually arise in later stages of the disease progression (Tarawneh and Holtzman, 2012; Sá et al., 2012; (Li et al., 2016).

Spatial tasks have been employed to investigate cognitive decline in rodents, and some of the tasks allow the detection of subtle changes in spatial behavior. This feature is relevant to the evaluation of mild hippocampal impairment, such as the initial degenerative process in animal models of AD. The Barnes maze is as spatial task in which the animals are trained to reach a hidden shelter guided by visual cues (Barnes, 1979; Barnes et al., 1989; Barnes et al., 1990; Barnes et al., 1980); O’Leary and Brown, 2012; Harrison et al., 2006). In this task, memory is evaluated by latency and distance to reach the target, time in target quadrant and number of errors (Sunyer et al., 2007; Rojanathammanee et al., 2013; Attar et al., 2013). In addition, subtle alterations in spatial search can be detected by the analysis of different search strategies to solve the task (Harrison et al., 2006). This behavioral task has been used to investigate spatial memory impairment in models of neurodegenerative conditions, including AD (Pompl et al., 1999; Reiserer et al., 2007; O’Leary and Brown, 2009).

Brain infusion of A β peptides is a well recognized rodent model of AD (Kowall et al., 1991; Nitta et al., 1994; Frautschy et al., 1996; Yamada and Nabeshima, 2000; Kang et al., 2015). However, most of the A β infusion studies focus the intermediate or late stages of the disease (Palop et al., 2003; Dickey et al., 2003; 2004; Blanchard et al., 2008; Blanchard et al., 2009), an approach that would diminish the contribution to the efficiency of potential neuroprotective treatments. In general, the protocols are conducted with large concentrations or long treatment durations (Han et al., 2011; Tran et al., 2011; Cioanca et al., 2013). To our knowledge, only one study investigated the effects of A β treatment in mice tested in the Barnes maze. This work showed a general performance deficit following long-term (35 days) infusion, without evaluation of different strategies (Morzelle et al., 2016). Here, we used a protocol of A β infusions that induces subtle memory deficits, which would be similar to initial stages in humans. The effects of this treatment were investigated in Barnes maze general performance and use of spatial or non-spatial search strategies. We hypothesize that the protocol of A β infusion used here will induce subtle deficits in the maze performance, specifically in the use of spatial strategies.

2 Material and Methods

2.1 Animals

Seventeen six-month-old male Wistar rats (350-500g) were kept in four or five animals per cage (30x37x16cm) under controlled conditions of temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) and luminosity (12/12h light/dark cycle, with lights turned on 7:00 a.m. and turned off 7:00 p.m.). Food and water were provided *ad libitum*. All rats were handled during three days, at least five minutes per day, previously to the beginning of the experiments. All procedures were in accordance to the Brazilian Law for the use of animals in scientific research (law 11.794) and approved by the local ethics committee (CEUA/UFRN, protocol no. 50/2014). All efforts were made to minimize pain, suffering or animal discomfort. Before the procedures, animals were allocated in the experimental room for habituation. The behavioral experiments were conducted in the mornings, beginning at 8 a.m.

2.2 Stereotaxic surgery

After anesthesia with ketamine (100mg/kg) and xylazin (50mg/kg), the animals were submitted to stereotaxic surgery and cannulas were implanted bilaterally into dorsal hippocampus subregion CA1 (AP: - 4.2 mm; LL: \pm 3.0 mm and DV: - 2.5 mm) and one in the lateral ventricle (i.c.v.; AP: - 1.0 mm; LL: \pm 1.8 mm and DV: - 3.3 mm). Right or left hemispheric location was randomized among rats. The coordinates were chosen according to a rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2007) and adjusted considering age. The microinjections were performed with an infusion pump and a 10 μ L microsyringe (Hamilton Company) connected to a 26-gauge steel needle into the brain sites.

2.3 Beta-amyloid (A β) infusion

Animals received infusions (0.5 μ L at the rate of 1 μ L/min) of A β or vehicle i.c.v. and CA1 (bilateral) on the first day, followed by 14 daily i.c.v. infusions. Animals in the A β group (n=9) received a 1:10 solution of 1-42 and 1-40 A β peptides (Suzuki et al., 1994; Iwatsubo et al., 1994; Gravina et al., 1995), equivalent to 30 pmoL per day, diluted in 0.9% saline. Before the beginning of infusions, each A β peptide solution was separately heated at 37°C for three days (Pike et al., 1991). Afterwards, 1-42 and 1-40 A β peptides (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) were put together and left at 37°C for 24h. Control animals receive the same volume of saline (n=5). Two saline and one A β animals were excluded from the analyses because they did not reach the target in the probe session.

2.4 Barnes maze

The Barnes maze is a spatial learning apparatus in which the animals search for an escape box (Barnes, 1979). The maze is a dark circular platform (120cm diameter), elevated 90 cm from the floor, containing 20 holes (10cm in diameter) disposed circularly at the edge of the platform. One of the holes (target hole) is connected to an escape box (10x10x15cm). There were visual cues on the walls, located 50cm distant from the apparatus. During the behavioral sessions, the lights were turned on (420 lux) to increase escape motivation. All experimental sessions were recorded by a video camera placed above the apparatus and analyzed with a video-tracking software (ANY-maze, Stoelting, USA).

In the habituation session, the animals were allowed to freely explore the apparatus during 150s or until the entrance in escape box. Afterwards, the animals were submitted to a set of four daily training sessions, each one with two trials. The inter-trials interval was the duration of cleaning the apparatus (with a 5% alcohol solution). The first training session was performed immediately after the habituation. All trials lasted 300s or until the animals reached the escape box. However, if the rats did not reach the target hole, the experimenter gently guided the animal towards it at the end of the trial. After reaching the escape box, animals remained inside for 60s. The escape box is always located in the same place during the training set, but not during the previous habituation session. Retrieval of spatial learning was evaluated in the probe session, which was conducted 3 days after the last training day. The procedure was similar to the training trials, but the escape box was removed. At the beginning of each session, the animals

were placed in an opaque container at the center of the maze. The container was then pulled up, and the animal was released to explore the maze. Between animals, the maze was cleaned and rotated to avoid odor cues (Figure 1).

The parameters analyzed were the percentage of time in the quadrants of the maze, the latency to reach the target hole, the distance traveled until reaching the target hole and the number of errors. We also analyzed search strategies (the kind of search performed to reach target), and analysis was conducted on the basis of previous studies (Bach et al., 1995; Harrison et al., 2006), with minor modifications. The search strategies were categorized into three types: spatial (or direct), serial or random (the two latter were considered non-spatial strategies). One search was computed each time the animal visited the target hole in the probe trial. The direct (spatial) strategy was computed when the animal moved directly to the target hole or to an adjacent hole before visiting the target hole. The serial strategy was computed when there were visits to at least three sequential holes in clockwise or counter-clockwise direction previously to the visit to the target hole. The random strategy was computed when at least three visits before the target hole happened in an unsystematic manner, i.e. the animal visited non-adjacent holes before visiting the target. The type of strategy was analyzed by the following approaches: (1) initial and last search (the strategy used to reach the target for the first and the last time in the probe trial); (2) total preference in the probe trial (the percent of use of each strategy across the whole probe trial (the number of times the animal used a certain strategy / total number of searches) and (3) the mean percentage of preferred strategy in each group.

2.5 Data analyses

We used Shapiro-Wilk test to check data distribution. We applied one-way ANOVA, one- or two-sample t-tests according to the parameter analyzed. For analyses across sessions, we performed repeated-measures ANOVA. Bonferroni *post-hoc* test was applied when necessary. Fisher's exact test (χ^2) was used for the analysis of the association between treatment (A β /saline) and preferred strategy, as well as the magnitude of this association in 95% confidence interval (*odds ratio*, OR, 95% CI). Data are shown as mean \pm S.E.M. We determined the level of significance at $p < 0.05$.

3. Results

The latency to reach the escape hole diminished over training sessions in both groups, indicating similar learning curves ($F_{1.7, 21.2} = 16.688$, $p < 0.001$, Bonferroni *posthoc*; Figure 2A). Indeed, we did not find differences between groups ($F_{1, 12} = 1.592$, $p = 0.231$) or factors interaction ($F_{1.7, 21.2} = 2.103$, $p = 0.151$). However, in the probe trial, A β group displayed longer latency to reach the target hole for the first time ($t_{12} = -2.679$, $p = 0.02$; Figure 2B).

We observed the same pattern of results for the distance traveled until the escape hole across the training sessions (session effect [$F_{3, 36} = 9.638$, $p < 0.001$], without group effect [$F_{1, 12} = 1.005$, $p = 0.336$] or interaction [$F_{3, 36} = 0.509$, $p = 0.678$], Bonferroni *posthoc*; Figure 2C). On the probe trial, we found that A β groups showed longer distance traveled until the target than saline ($t_{12} = -2.636$, $p = 0.022$; Figure 2D).

The number of errors reduced across the training sessions for both groups ($F_{3,36} = 5.419$, $p=0.004$, Bonferroni *posthoc*; Figure 3A). In addition, we did not find differences between groups ($F_{1,12} = 0.573$, $p=0.464$) or factors interaction ($F_{3,36} = 0.218$, $p=0.883$). Likewise, on the probe trial, there was no difference between the groups ($t_{12} = -0.985$, $p = 0.344$; Figure 3B).

Additionally, both groups showed increased time in the target quadrant across trainings ($F_{3,36} = 14.954$, $p<0.001$, Bonferroni *posthoc*; Figure 4A), without treatment effect ($F_{1,12} = 0.416$, $p=0.531$) or factors interaction ($F_{3,36} = 0.946$, $p=0.429$). On the probe trial, there was no difference between groups ($t_{12} = 0.736$, $p=0.476$; Figure 4B).

We found a significant effect of treatment on the search strategy in the probe trial. Saline group preferred the spatial strategy as initial choice compared to A β group (Fisher's exact test, $\chi^2(1) = 95.998$, $p < 0.001$; Figure 5A). The probability that saline group had used the spatial strategy was 32 times higher than A β group (OR 32.36, 95% CI: 14.61 – 71.69).

Considering the search strategies in the whole probe session, the A β group used less spatial search strategy compared to saline (Fisher's exact test, $\chi^2(1)=20.276$, $p<0.001$; OR 5.091, 95% IC 2.456 – 10.553, Figure 5B). In addition, the analysis of groups by strategy in the whole probe session (including animals that preferred random or serial strategies and had no preference into the non-spatial category), A β group sustains the preferential use of non-spatial search strategies compared to saline animals (Fisher's exact test, $\chi^2(1)=7.574$, $p=0.009$; OR 2.364, 95% IC 1.272 – 4.392; Figure 5C).

We also analyzed the last choice, i.e., the strategy used to reach the target for the last time in the probe session. We found that the A β group persevered on non-spatial strategies, while saline-treated animals changed preference towards the end of the probe session. Indeed, within subjects analyses (first versus last choices) confirmed the change of preference in saline group ($\chi^2(1)=72.000$, $p<0.001$; OR, 16.000, 95% CI: 8.002 – 31.994), and the persistence of preference for non-spatial strategies in the A β group ($\chi^2(1)=4.391$, $p=0.056$; OR, 0.438, 95% CI: 0.200 – 0.961). In addition, the use of strategies as last choice did not differ between groups ($\chi^2(1)=3.196$, $p = 0.082$; OR 2.045, % CI: 0.924-4.529). In table 1, we show the percent of animals that show spatial and non-spatial preferences for the first three and the last choice in the probe session. We show four choices because it was the minimum number of strategies used by a subject in the probe session.

The comparison of means of percentage of strategies in the groups in the whole probe session showed that saline group used possible search strategies similarly (spatial, $t_4 = -0.636$, $p=0.559$; non-spatial, $t_4 = 0.685$, $p=0.531$), while the A β group preferred non-spatial search strategies (spatial, $t_8 = -3.020$, $p=0.017$; non-spatial, $t_8 = 3.121$, $p=0.014$; Figure 5D).

4. Discussion

We observed that both groups showed reduced distance and latency to reach target and number of errors, and increased percent time in the target quadrant across the trainings, indicating that all the animals learned the task (Barnes, 1979; Pompl et al., 1999).

Moreover, we found that animals that received A β peptides showed impairments when the latency and distance to reach the target were analyzed in the probe trial. However, no differences were found to the other performance parameters (number of errors and percent time in the target quadrant) in the probe session, suggesting that A β animals showed some extent of retrieval. In addition, we found that A β -infused animals preferentially used non-spatial search strategies, corroborating an impairment in spatial retrieval, despite the performance was not completely impaired. Finally, there were no differences in the distance travelled in the maze between saline and A β groups, indicating that A β peptides infusion did not modify motor activity (data not shown).

Our data are in line with previous studies that suggest that the amyloid aggregation impairs hippocampal connectivity, which is necessary for spatial navigation and for strategy choice (Pouzet et al., 2002; Savonenko et al., 2005; O'Leary and Brown, 2009). In the present study, when the search strategies to reach target were analyzed, saline group preferred the spatial strategy to the non-spatial strategy, while A β animals had the opposite preference. This outcome suggests that the deficit promoted by beta-amyloid was revealed by the kind of search navigation, which has modified the spatial performance. Of note, when the analysis of search strategies was performed for mean percentage of search strategy within the groups, A β animals showed increased preference for non-spatial search strategies. However, saline animals did not show differences from chance for both strategies. This apparently contradictory outcome might be due to a tendency to randomization of safe place search towards the end of the session, because the escape box is no longer present (Harrison et al., 2006). Indeed, in line with previous findings, saline animals changed preference across the probe session, and preferred spatial strategies as first choice as opposed to non-spatial strategies as last choice. Conversely, A β animals persevered on the non-spatial strategies, showing preference for this type of navigation towards the end of the probe session as well (see table 1).

The Barnes maze has been used in studies of spatial learning and memory in transgenic models of AD (Pompl et al., 1999; Reiserer et al., 2007; O'Leary and Brown, 2009). Pompl, et al. (1999) suggested that transgenic animals have difficulty to use spatial reference memory to reach a specific place (Chapman et al., 1999; Chen et al., 2000; Janus, 2004). This outcome resembles the memory deficit found in AD patients (Kaskie and Storandt, 1995) due to hippocampal function impairment (McNaughton et al., 1989; Poucet et al., 1991; McDonald and White, 1993). Rodriguez et al. (2013) demonstrated that APOE4 (an AD risk allele) mice showed delayed learning and impaired retrieval in the Barnes task. These animals also showed reduction in length and density of dendritic spines in the medial entorhinal cortex, and these alterations were related to early-impaired spatial cognition. Prut et al. (2007) showed that the AD transgenic mice APP23 had increased latency to reach the target and number of errors throughout the trainings in the Barnes maze, along with plaque deposition in the hippocampus and

neocortex. Moreover, these animals had delays to switch from non-spatial to spatial strategies in the course of training. In the present study, we did not observe alterations during the training sessions of the Barnes maze, probably due to the mild nature of the cognitive deficit induced by our protocol. Indeed, we only observed spatial retrieval impairment in the probe trial.

In line with the deficit in the retrieval of spatial information, Janus (2004) found that AD transgenic mice (TgCRND8) did not use spatial strategies in the Morris water maze; they learned to reach the goal using a non-spatial strategy. Hamm et al. (2017) have also studied the transgenic TgCRND8 model, and showed an impaired association between object and place in a hippocampal dependent-task. In general, these previous studies suggest that the impairment in learning and retrieval of memory in AD models are due to deficits in the use of spatial strategies promoted by A β peptides increase and/or accumulation. In line with these findings, the results reported here show subtle alterations in spatial performance and the preferential use of non-spatial strategies after A β peptides infusion, suggesting a similarity with the early stages of AD.

Human versions of rodent spatial mazes in virtual environments have been used for detection of spatial memory deficits induced by hippocampal damage (Skelton et al., 2000; Moffat et al., 2001; Astur et al., 2002; Bohbot et al., 2004; Bartsch et al., 2010; Goodrich-Hunsaker et al., 2010; Kumaran et al., 2007). These investigations of spatial navigation in humans could allow early detection of dementia, which is relevant for early therapeutic intervention.

Nevertheless, similar to rodent tasks, the continuous exposition to such tasks diminishes the possibility of impairment detection (Jansen et al., 2010). On the other hand, the delayed retrieval assessment allows the detection of the episodic memory deficit (Albert, 1997; Foster, 1999). In this respect, contrary to the results described in the present study, Hamm et al. (2017) did not verify an impairment in the Barnes maze performance. This discrepancy is probably due to the reduced number of training trials and increased retrieval delay in our study. Thus, these protocol modifications allowed the detection of a spatial deficit similarly to the delayed retrieval protocol used in humans for the study of early impairments in AD.

The detailed etiology of Alzheimer remains unknown, although a great amount of evidence points to A β peptides as contributing factors to the neuronal dysfunctions and cognitive deficits of the disease (Braak & Braak, 1991a); Palop et al., 2003; Dickey et al., 2003; 2004; Eustache et al., 2004; Sadek et al., 2004). The protocol of A β infusion used here induced a subtle cognitive deficit that was specific to spatial aspects, possibly compatible with prodromic characteristics of AD. Animals under A β treatment showed some extent of retrieval, but using non-spatial strategies. Further, these animals persevered on non-spatial choices until the end of the probe session. The results indicate that a task that can be solved by both spatial and non-spatial strategies is sensitive to detect deficits that could go unnoticed otherwise. The detection of subtle changes on cognition in an animal model can be useful to investigations of mechanisms as well as tests of potential neuroprotective approaches. We suggest that this approach is potentially useful to the study of the initial memory deficits in early AD.

5. Table

Table 1 - Percentage of strategies used at the first three and the last choices in the probe trial.

Group	Type of strategy	Choice in the probe session			
		1st	2nd	3rd	Last
Saline	Spatial	80,00	60,00	40,00	20,00 [#]
	Non-spatial	20,00	40,00	60,00	80,00 [#]
A β	Spatial	11,11*	44,44	22,22	22,22
	Non-spatial	88,89*	55,56	77,78	77,78

Fisher's exact test, χ^2 , $p < 0.05$: *compared to saline; # compared to first choice

6. Figure legends

FIGURE 1 Experimental design. Rats were infused with saline or A β solution for 15 days (D0 to D14); at D0, CA1 and I.C.V. infusion; from D1 to D11, only I.C.V. infusion. After the 11th infusion, the rats were submitted to the habituation phase (Hab), followed by acquisition phase (two series of four two-trial daily trainings, Tr1 to Tr4, D11 to D14). On the 3th day after the last training day, they were tested for task retrieval (90s probe trial, D17). The perfusion for immunohistochemistry was conducted 1h after the probe trial.

FIGURE 2 Latency and distance until escape in training (TR) sessions and until target hole in probe trial. **A, C**, effect of session for both groups (repeated measures two-way ANOVA, Bonferroni *posthoc*); * $p < 0.05$ compared to TR1. **B, D**, unpaired t-test; * $p < 0.05$ compared to SALINE. Mean + SEM.

FIGURE 3 Number of errors in training sessions (TR, A) and probe trial (B). **A**, effect of session for both groups (repeated measures two-way ANOVA, Bonferroni *posthoc*); * $p < 0.05$ compared to TR1. **B**, unpaired t-test; $p > 0.05$. Mean + SEM.

FIGURE 4 Percent time in target quadrant in training sessions (TR, A) and probe trial (B). **A**, effect of session for both groups (repeated measures two-way ANOVA, Bonferroni *posthoc*); * $p < 0.05$ compared to TR1. **B**, unpaired t-test; $p > 0.05$. Mean + SEM.

FIGURE 5 Percentage of strategy use at initial choice (A) and in the total (B, C) probe trial. **A, B**, Saline had increased initial (A) and total (B) spatial strategy choice compared to A β group. **C**, the preferential use of spatial strategy by saline is sustained when spatial, non-spatial and without preference are grouped into non-spatial strategy. **A, B, C**, Data are percentage of strategy compared between the groups. Fisher's exact test, χ^2 , $p < 0.05$. **D**, percentage time in spatial and non-spatial strategy (mean + SEM) differed from chance for A β , but not for saline group (one-sample t-test). * $p < 0.05$ compared to chance (dashed line).

6. Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

7. Author Contributions

P.T.M., R.H.L. and R.H.S. designed the research and wrote the paper. P.T.M., A.C.Q.A., Y.S.R.M., L.E.M.B. and C.L.C.C. collected and analysed the data. M.R.C. and A.M.R. contributed with theoretical and technical support.

8. Funding

The research was supported by fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant # 402054/2010-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte (FAPERN/PRONEX) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grant #2015/12308-5).

9. Acknowledgements

The authors would like to thank Mateus Oliveira Silva, Sara Sophia Guedes and Marília Felipe for technical support.

10. References

- Albert, M. S. (1997). The ageing brain: normal and abnormal memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 352(1362), 1703-1709. doi:10.1098/rstb.1997.0152
- Bach M.E, H.R., Osman M, Kandel E.R., Mayford M. (1995). Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell Mol Biol Lett* 6(16; 81), 905-915.
- Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 93(1), 74-104.
- Barnes, C. A., Eppich, C., and Rao, G. (1989). Selective improvement of aged rat short-term spatial memory by 3,4-diaminopyridine. *Neurobiol Aging*, 10(4), 337-341.
- Barnes, C. A., Markowska, A. L., Ingram, D. K., Kametani, H., Spangler, E. L., Lemken, V. J., and Olton, D. S. (1990). Acetyl-L-carnitine. 2: Effects on learning and memory performance of aged rats in simple and complex mazes. *Neurobiol Aging*, 11(5), 499-506.
- Barnes, C. A., Nadel, L., and Honig, W. K. (1980). Spatial memory deficit in senescent rats. *Can J Psychol*, 34(1), 29-39.
- Barnes, C. A., Rao, G., and Shen, J. (1997). Age-related decrease in the N-methyl-D-aspartateR-mediated excitatory postsynaptic potential in hippocampal region CA1. *Neurobiol Aging*, 18(4), 445-452.

- Blanchard, J., Decorte, L., Nogues, X., and Micheau, J. (2009). Characterization of cognition alteration across the course of the disease in APP751SL mice with parallel estimation of cerebral Abeta deposition. *Behav Brain Res*, 201(1), 147-157. doi:10.1016/j.bbr.2009.02.005
- Blanchard, J., Martel, G., Guillou, J. L., Nogues, X., and Micheau, J. (2008). Impairment of spatial memory consolidation in APP(751SL) mice results in cue-guided response. *Neurobiol Aging*, 29 (7), 1011-1021. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.010
- Bohbot, V. D., Iaria, G., and Petrides, M. (2004). Hippocampal function and spatial memory: evidence from functional neuroimaging in healthy participants and performance of patients with medial temporal lobe resections. *Neuropsychology*, 18(3), 418-425. doi:10.1037/0894-4105.18.3.418
- Braak, H., and Braak, E. (1991a). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol*, 1(3), 213-216.
- Braak, H., and Braak, E. (1991b). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4), 239-259.
- Braak, H., Jellinger, K., Braak, E., and Bohl, J. (1992). Allocortical neurofibrillary changes in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol*, 84(5), 478-483.
- Cioanca, O., Hritcu, L., Mihasan, M., and Hancianu, M. (2013). Cognitive-enhancing and antioxidant activities of inhaled coriander volatile oil in amyloid beta(1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Physiol Behav* 120, 193-202. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.08.006.
- Chapman, P. F., White, G. L., Jones, M. W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V. J., Irizarry, M., Hsiao, K. K. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci*, 2(3), 271-276. doi:10.1038/6374
- Chen, G., Chen, K. S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S. J., Morris, R. G. (2000). A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 408(6815), 975-979. doi:10.1038/35050103
- Desikan, R. S., McEvoy, L. K., Holland, D., Thompson, W. K., Brewer, J. B., Aisen, P. S., Dale, A. M. (2013). Apolipoprotein E epsilon4 does not modulate amyloid-beta-associated neurodegeneration in preclinical Alzheimer disease. *AJNR Am J Neuroradiol*, 34(3), 505-510. doi:10.3174/ajnr.A3267
- Dickey, C. A., Gordon, M. N., Mason, J. E., Wilson, N. J., Diamond, D. M., Guzowski, J. F., and Morgan, D. (2004). Amyloid suppresses induction of genes critical for memory consolidation in APP + PS1 transgenic mice. *J Neurochem*, 88(2), 434-442.
- Dickey, C. A., Loring, J. F., Montgomery, J., Gordon, M. N., Eastman, P. S., and Morgan, D. (2003). Selectively reduced expression of synaptic plasticity-related genes in amyloid precursor protein + presenilin-1 transgenic mice. *J Neurosci*, 23(12), 5219-5226.
- Eustache, F., Piolino, P., Giffard, B., Viader, F., De La Sayette, V., Baron, J. C., and Desgranges, B. (2004). 'In the course of time': a PET study of the cerebral substrates

- of autobiographical amnesia in Alzheimer's disease. *Brain*, 127(Pt 7), 1549-1560. doi:10.1093/brain/awh166
- Foster, T. C. (1999). Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res Brain Res Rev*, 30(3), 236-249.
- Foster, T. C., Evelyn F. and William L. McKnight (2012). Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 4. doi:10.3389/fnagi.2012.00012
- Frautschy, S.A., Yang, F., Calderon, L., and Cole, G.M. (1996). Rodent models of Alzheimer's disease: rat A beta infusion approaches to amyloid deposits. *Neurobiol Aging* 17(2), 311-321.
- Goodrich-Hunsaker, N. J., Livingstone, S. A., Skelton, R. W., and Hopkins, R. O. (2010). Spatial deficits in a virtual water maze in amnesic participants with hippocampal damage. *Hippocampus*, 20(4), 481-491. doi:10.1002/hipo.20651
- Gravina, S. A., Ho, L., Eckman, C. B., Long, K. E., Otvos, L., Jr., Younkin, L. H., Younkin, S. G. (1995). Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). *J Biol Chem*, 270(13), 7013-7016.
- Hamm, V., Heraud, C., Bott, J. B., Herbeaux, K., Strittmatter, C., Mathis, C., and Goutagny, R. (2017). Differential contribution of APP metabolites to early cognitive deficits in a TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Adv*, 3(2), e1601068. doi:10.1126/sciadv.1601068
- Han, M., Liu, Y., Tan, Q., Zhang, B., Wang, W., Liu, J., et al. (2011). Therapeutic efficacy of stemazole in a beta-amyloid injection rat model of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 657(1-3), 104-110. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.01.065.
- Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356. doi:10.1126/science.1072994
- Harrison, F. E., Reiserer, R. S., Tomarken, A. J., and McDonald, M. P. (2006). Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learn Mem*, 13(6), 809-819. doi:10.1101/lm.334306
- Head, D., and Isom, M. (2010). Age effects on wayfinding and route learning skills. *Behav Brain Res*, 209(1), 49-58. doi:10.1016/j.bbr.2010.01.012
- Iaria, G., Palermo, L., Committeri, G., and Barton, J. J. (2009). Age differences in the formation and use of cognitive maps. *Behav Brain Res*, 196(2), 187-191. doi:10.1016/j.bbr.2008.08.040
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*, 13(1), 45-53.

- Jansen, P., Schmelter, A., and Heil, M. (2010). Spatial knowledge acquisition in younger and elderly adults: a study in a virtual environment. *Exp Psychol*, 57(1), 54-60. doi:10.1027/1618-3169/a000007
- Janus, C. (2004). Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learn Mem*, 11(3), 337-346. doi:10.1101/lm.70104
- Kang, S., Moon, N. R., Kim, D. S., Kim, S. H., and Park, S. (2015). Central acylated ghrelin improves memory function and hippocampal AMPK activation and partly reverses the impairment of energy and glucose metabolism in rats infused with beta-amyloid. *Peptides*, 71, 84-93. doi:10.1016/j.peptides.2015.07.005
- Kaskie, B., and Storandt, M. (1995). Visuospatial deficit in dementia of the Alzheimer type. *Arch Neurol*, 52(4), 422-425.
- Kowall, N. W., Beal, M. F., Busciglio, J., Duffy, L. K., and Yankner, B. A. (1991). An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(16), 7247-7251.
- Kumaran, D., Hassabis, D., Spiers, H. J., Vann, S. D., Vargha-Khadem, F., and Maguire, E. A. (2007). Impaired spatial and non-spatial configural learning in patients with hippocampal pathology. In *Neuropsychologia* (Vol. 45, pp. 2699-2711).
- Lithfous, S., Dufour, A., and Despres, O. (2013). Spatial navigation in normal aging and the prodromal stage of Alzheimer's disease: insights from imaging and behavioral studies. *Ageing Res Rev*, 12(1), 201-213. doi:10.1016/j.arr.2012.04.007
- McDonald, R. J., and White, N. M. (1993). A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci*, 107(1), 3-22.
- McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Meltzer, J., and Sutherland, R. J. (1989). Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Exp Brain Res*, 76(3), 485-496.
- McNaughton B.L., Morris R.G.M. (1987). Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory systems. *Trends Neurosci*. 10: 408-415.
- Moffat, S. D., Elkins, W., and Resnick, S. M. (2006). Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation. *Neurobiol Aging*, 27(7), 965-972. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.011
- Moffat, S. D., Zonderman, A. B., and Resnick, S. M. (2001). Age differences in spatial memory in a virtual environment navigation task. *Neurobiol Aging*, 22(5), 787-796.
- Morzelle, M.C., Salgado, J.M., Telles, M., Mourelle, D., Bachiega, P., Buck, H.S., et al. (2016). Neuroprotective Effects of Pomegranate Peel Extract after Chronic Infusion with Amyloid-beta Peptide in Mice. *PLoS One* 11(11), e0166123. doi: 10.1371/journal.pone.0166123.
- Nadel, L., & MacDonald, L. (1980). Hippocampus: cognitive map or working memory? *Behav Neural Biol*, 29(3), 405-409.

- Nitta, A., Itoh, A., Hasegawa, T., and Nabeshima, T. (1994). beta-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett*, 170(1), 63-66.
- O'Leary, T. P., and Brown, R. E. (2009). Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*, 201(1), 120-127. doi:10.1016/j.bbr.2009.01.039
- O'Leary, T. P., and Brown, R. E. (2012). The effects of apparatus design and test procedure on learning and memory performance of C57BL/6J mice on the Barnes maze. *J Neurosci Methods*, 203(2), 315-324. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.09.027
- Palop, J. J., Chin, J., Bien-Ly, N., Massaro, C., Yeung, B. Z., Yu, G. Q., and Mucke, L. (2005). Vulnerability of dentate granule cells to disruption of arc expression in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci*, 25(42), 9686-9693. doi:10.1523/jneurosci.2829-05.2005
- Palop, J. J., Chin, J., Roberson, E. D., Wang, J., Thwin, M. T., Bien-Ly, N., Mucke, L. (2007). Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron*, 55(5), 697-711. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.025
- Palop, J. J., Jones, B., Kekoni, L., Chin, J., Yu, G. Q., Raber, J., Mucke, L. (2003). Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16), 9572-9577. doi:10.1073/pnas.1133381100
- Paxinos, G. and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edn. Oxford: Elsevier.
- Antonova, E., Parslow, D., Brammer, M., Dawson, G. R., Jackson, S. H., & Morris, R. G. (2009). Age-related neural activity during allocentric spatial memory. *Memory*, 17(2), 125-143. doi:10.1080/09658210802077348
- Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 93(1), 74-104.
- Barnes, C. A., Eppich, C., & Rao, G. (1989). Selective improvement of aged rat short-term spatial memory by 3,4-diaminopyridine. *Neurobiol Aging*, 10(4), 337-341.
- Barnes, C. A., Markowska, A. L., Ingram, D. K., Kametani, H., Spangler, E. L., Lemken, V. J., & Olton, D. S. (1990). Acetyl-L-carnitine. 2: Effects on learning and memory performance of aged rats in simple and complex mazes. *Neurobiol Aging*, 11(5), 499-506.
- Barnes, C. A., Nadel, L., & Honig, W. K. (1980). Spatial memory deficit in senescent rats. *Can J Psychol*, 34(1), 29-39.
- Braak, H., & Braak, E. (1991a). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol*, 1(3), 213-216.
- Braak, H., & Braak, E. (1991b). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4), 239-259.
- Braak, H., Jellinger, K., Braak, E., & Bohl, J. (1992). Allocortical neurofibrillary changes in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol*, 84(5), 478-483.
- Gandy, S., Simon, A. J., Steele, J. W., Lublin, A. L., Lah, J. J., Walker, L. C., . . . Ehrlich, M. E. (2010). Days to criterion as an indicator of toxicity associated with human

- Alzheimer amyloid-beta oligomers. *Ann Neurol*, 68(2), 220-230. doi:10.1002/ana.22052
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D., & Mansuy, I. M. (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature*, 418(6901), 970-975. doi:10.1038/nature00928
- Geula, C., Wu, C. K., Saroff, D., Lorenzo, A., Yuan, M., & Yankner, B. A. (1998). Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med*, 4(7), 827-831.
- Gomez-Isla, T., Price, J. L., McKeel, D. W., Jr., Morris, J. C., Growdon, J. H., & Hyman, B. T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 16(14), 4491-4500.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356. doi:10.1126/science.1072994
- Jones, M. W., Errington, M. L., French, P. J., Fine, A., Bliss, T. V., Garel, S., . . . Davis, S. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci*, 4(3), 289-296. doi:10.1038/85138
- Kogan, J. H., Frankland, P. W., Blendy, J. A., Coblentz, J., Marowitz, Z., Schutz, G., & Silva, A. J. (1997). Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr Biol*, 7(1), 1-11.
- Kukulja, J., Thiel, C. M., Wilms, M., Mirzazade, S., & Fink, G. R. (2009). Ageing-related changes of neural activity associated with spatial contextual memory. *Neurobiol Aging*, 30(4), 630-645. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.015
- LaFerla, F. M., & Oddo, S. (2005). Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med*, 11(4), 170-176. doi:10.1016/j.molmed.2005.02.009
- Li, X., Wang, H., Tian, Y., Zhou, S., Wang, K., & Yu, Y. (2016). Impaired White Matter Connections of the Limbic System Networks Associated with Impaired Emotional Memory in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*, 8, 250. doi:10.3389/fnagi.2016.00250
- Magnusson, K. R., Scruggs, B., Aniya, J., Wright, K. C., Ontl, T., Xing, Y., & Bai, L. (2003). Age-related deficits in mice performing working memory tasks in a water maze. *Behav Neurosci*, 117(3), 485-495.
- Moffat, S. D., Elkins, W., & Resnick, S. M. (2006). Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation. *Neurobiol Aging*, 27(7), 965-972. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.011
- Sadek, J. R., Johnson, S. A., White, D. A., Salmon, D. P., Taylor, K. I., Delapena, J. H., . . . Grant, I. (2004). Retrograde amnesia in dementia: comparison of HIV-associated dementia, Alzheimer's disease, and Huntington's disease. *Neuropsychology*, 18(4), 692-699. doi:10.1037/0894-4105.18.4.692
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., . . . Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, 30(4), 572-580. doi:10.1002/ana.410300410
- Thal, D. R., Rub, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791-1800.

- West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., & Troncoso, J. C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*, 344(8925), 769-772.
- Yamada, K., & Nabeshima, T. (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther*, 88(2), 93-113.
- Antonova, E., Parslow, D., Brammer, M., Dawson, G. R., Jackson, S. H., & Morris, R. G. (2009). Age-related neural activity during allocentric spatial memory. *Memory*, 17(2), 125-143. doi:10.1080/09658210802077348
- Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 93(1), 74-104.
- Barnes, C. A., Eppich, C., & Rao, G. (1989). Selective improvement of aged rat short-term spatial memory by 3,4-diaminopyridine. *Neurobiol Aging*, 10(4), 337-341.
- Barnes, C. A., Markowska, A. L., Ingram, D. K., Kametani, H., Spangler, E. L., Lemken, V. J., & Olton, D. S. (1990). Acetyl-L-carnitine. 2: Effects on learning and memory performance of aged rats in simple and complex mazes. *Neurobiol Aging*, 11(5), 499-506.
- Barnes, C. A., Nadel, L., & Honig, W. K. (1980). Spatial memory deficit in senescent rats. *Can J Psychol*, 34(1), 29-39.
- Braak, H., & Braak, E. (1991a). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol*, 1(3), 213-216.
- Braak, H., & Braak, E. (1991b). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4), 239-259.
- Braak, H., Jellinger, K., Braak, E., & Bohl, J. (1992). Allocortical neurofibrillary changes in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol*, 84(5), 478-483.
- Gandy, S., Simon, A. J., Steele, J. W., Lublin, A. L., Lah, J. J., Walker, L. C., . . . Ehrlich, M. E. (2010). Days to criterion as an indicator of toxicity associated with human Alzheimer amyloid-beta oligomers. *Ann Neurol*, 68(2), 220-230. doi:10.1002/ana.22052
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D., & Mansuy, I. M. (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature*, 418(6901), 970-975. doi:10.1038/nature00928
- Geula, C., Wu, C. K., Saroff, D., Lorenzo, A., Yuan, M., & Yankner, B. A. (1998). Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med*, 4(7), 827-831.
- Gomez-Isla, T., Price, J. L., McKeel, D. W., Jr., Morris, J. C., Growdon, J. H., & Hyman, B. T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 16(14), 4491-4500.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356. doi:10.1126/science.1072994
- Jones, M. W., Errington, M. L., French, P. J., Fine, A., Bliss, T. V., Garel, S., . . . Davis, S. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci*, 4(3), 289-296. doi:10.1038/85138
- Kogan, J. H., Frankland, P. W., Blendy, J. A., Coblenz, J., Marowitz, Z., Schutz, G., & Silva, A. J. (1997). Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr Biol*, 7(1), 1-11.

- Kukolja, J., Thiel, C. M., Wilms, M., Mirzazade, S., & Fink, G. R. (2009). Ageing-related changes of neural activity associated with spatial contextual memory. *Neurobiol Aging*, 30(4), 630-645. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.015
- LaFerla, F. M., & Oddo, S. (2005). Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med*, 11(4), 170-176. doi:10.1016/j.molmed.2005.02.009
- Li, X., Wang, H., Tian, Y., Zhou, S., Wang, K., & Yu, Y. (2016). Impaired White Matter Connections of the Limbic System Networks Associated with Impaired Emotional Memory in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*, 8, 250. doi:10.3389/fnagi.2016.00250
- Magnusson, K. R., Scruggs, B., Aniya, J., Wright, K. C., Ontl, T., Xing, Y., & Bai, L. (2003). Age-related deficits in mice performing working memory tasks in a water maze. *Behav Neurosci*, 117(3), 485-495.
- Moffat, S. D., Elkins, W., & Resnick, S. M. (2006). Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation. *Neurobiol Aging*, 27(7), 965-972. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.011
- Sadek, J. R., Johnson, S. A., White, D. A., Salmon, D. P., Taylor, K. I., Delapena, J. H., . . . Grant, I. (2004). Retrograde amnesia in dementia: comparison of HIV-associated dementia, Alzheimer's disease, and Huntington's disease. *Neuropsychology*, 18(4), 692-699. doi:10.1037/0894-4105.18.4.692
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., . . . Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, 30(4), 572-580. doi:10.1002/ana.410300410
- Thal, D. R., Rub, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791-1800.
- West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., & Troncoso, J. C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*, 344(8925), 769-772.
- Yamada, K., & Nabeshima, T. (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther*, 88(2), 93-113.
- Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., and Cotman, C. W. (1991). In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res*, 563(1-2), 311-314.
- Plancher, G., Gyselinck, V., Nicolas, S., and Piolino, P. (2010). Age effect on components of episodic memory and feature binding: A virtual reality study. *Neuropsychology*, 24(3), 379-390. doi:10.1037/a0018680
- Pompl, P. N., Mullan, M. J., Bjugstad, K., and Arendash, G. W. (1999). Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: use in detecting cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci Methods*, 87(1), 87-95.
- Poucet, B., Herrmann, T., and Buhot, M. C. (1991). Effects of short-lasting inactivations of the ventral hippocampus and medial septum on long-term and short-term acquisition of spatial information in rats. *Behav Brain Res*, 44(1), 53-65.

- Pouzet, B., Zhang, W. N., Feldon, J., and Rawlins, J. N. (2002). Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies. *Behav Brain Res*, 133(2), 279-291.
- Prut, L., Abramowski, D., Krucker, T., Levy, C. L., Roberts, A. J., Staufenbiel, M., and Wiessner, C. (2007). Aged APP23 mice show a delay in switching to the use of a strategy in the Barnes maze. *Behav Brain Res*, 179(1), 107-110. doi:10.1016/j.bbr.2007.01.017
- Reiserer, R. S., Harrison, F. E., Syverud, D. C., and McDonald, M. P. (2007). Impaired spatial learning in the APPSwe + PSEN1DeltaE9 bigenic mouse model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav*, 6(1), 54-65. doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00221.x
- Rodriguez, G. A., Burns, M. P., Weeber, E. J., and Rebeck, G. W. (2013). Young APOE4 targeted replacement mice exhibit poor spatial learning and memory, with reduced dendritic spine density in the medial entorhinal cortex. *Learn Mem*, 20(5), 256-266. doi:10.1101/lm.030031.112
- Rojanathammanee, L., Puig, K. L., and Combs, C. K. (2013). Pomegranate polyphenols and extract inhibit nuclear factor of activated T-cell activity and microglial activation in vitro and in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Nutr*, 143(5), 597-605. doi:10.3945/jn.112.169516
- Sa, F., Pinto, P., Cunha, C., Lemos, R., Letra, L., Simoes, M., and Santana, I. (2012). Differences between Early and Late-Onset Alzheimer's Disease in Neuropsychological Tests. *Front Neurol*, 3, 81. doi:10.3389/fneur.2012.00081
- Sadek, J. R., Johnson, S. A., White, D. A., Salmon, D. P., Taylor, K. I., Delapena, J. H., Grant, I. (2004). Retrograde amnesia in dementia: comparison of HIV-associated dementia, Alzheimer's disease, and Huntington's disease. *Neuropsychology*, 18(4), 692-699. doi:10.1037/0894-4105.18.4.692
- Savonenko, A., Xu, G. M., Melnikova, T., Morton, J. L., Gonzales, V., Wong, M. P., . . . Borchelt, D. R. (2005). Episodic-like memory deficits in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol Dis*, 18(3), 602-617. doi:10.1016/j.nbd.2004.10.022
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., and Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1), a006189. doi:10.1101/cshperspect.a006189
- Skelton, R. W., Bukach, C. M., Laurance, H. E., Thomas, K. G., and Jacobs, J. W. (2000). Humans with traumatic brain injuries show place-learning deficits in computer-generated virtual space. *J Clin Exp Neuropsychol*, 22(2), 157-175. doi:10.1076/1380-3395(200004)22:2;1-1;ft157
- Sunyer B, Patil S, Hoyer H, Lubec G. (2007). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Nature protocols*. 390. doi:10.1038/nprot.2007.390.

- Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L., Jr., Eckman, C., Younkin, S. G. (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*, 264(5163), 1336-1340.
- Tarawneh, R., and Holtzman, D. M. (2012). The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(5), a006148. doi:10.1101/cshperspect.a006148
- Tran, T.T., Srivareerat, M., Alhaider, I.A., and Alkadhi, K.A. (2011). Chronic psychosocial stress enhances long-term depression in a subthreshold amyloid-beta rat model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 119(2), 408-416. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07437.x.
- West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., and Troncoso, J. C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*, 344(8925), 769-772.
- Yamada, K., and Nabeshima, T. (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther*, 88(2), 93-113.

Figure 1

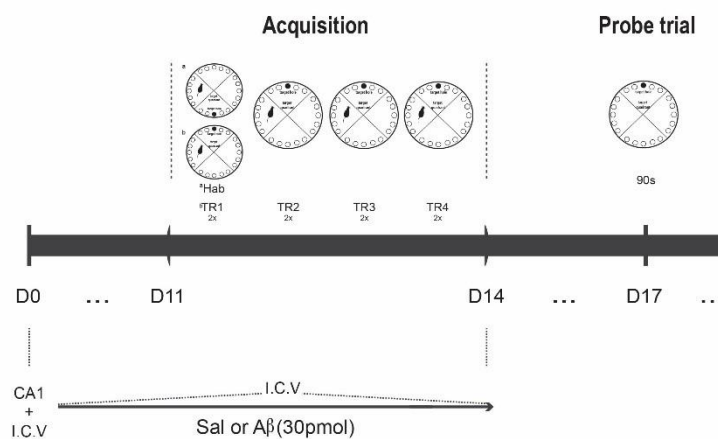


Figure 2

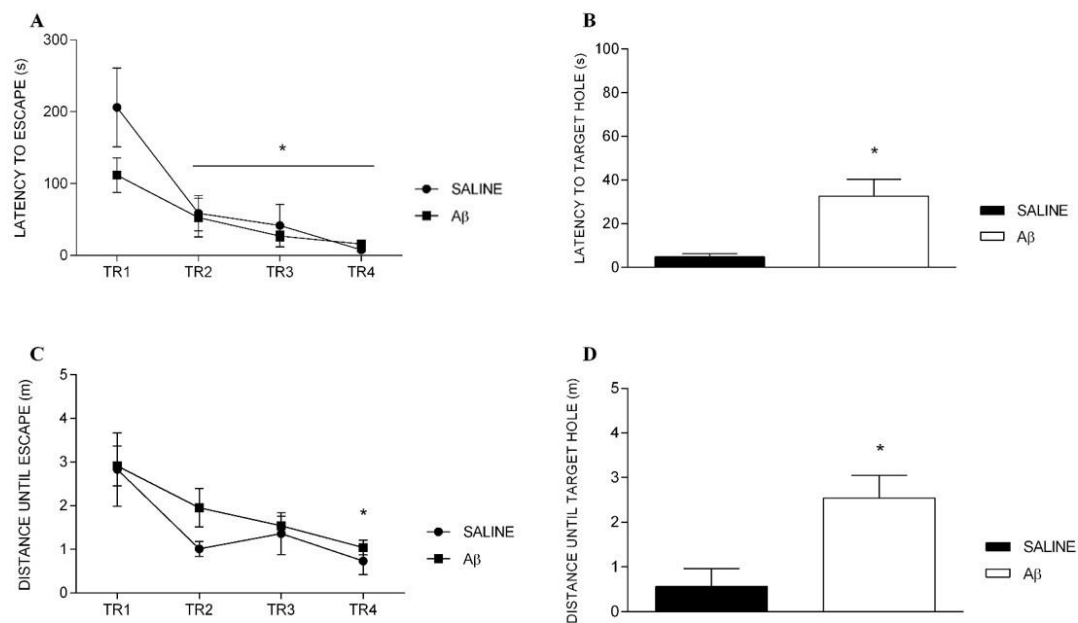


Figure 3

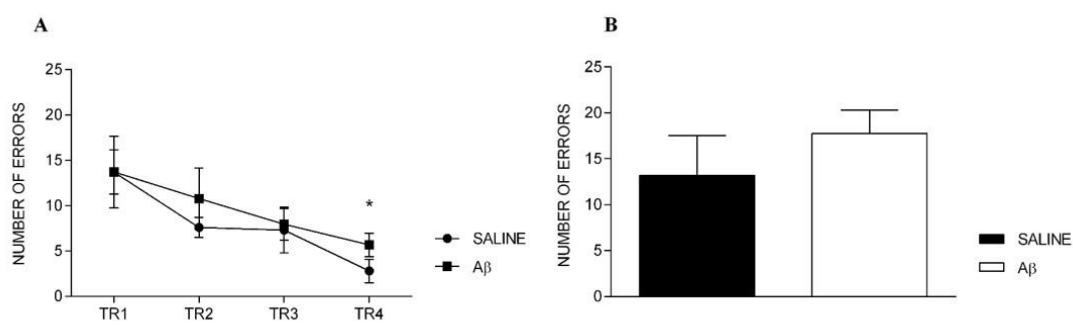


Figure 4

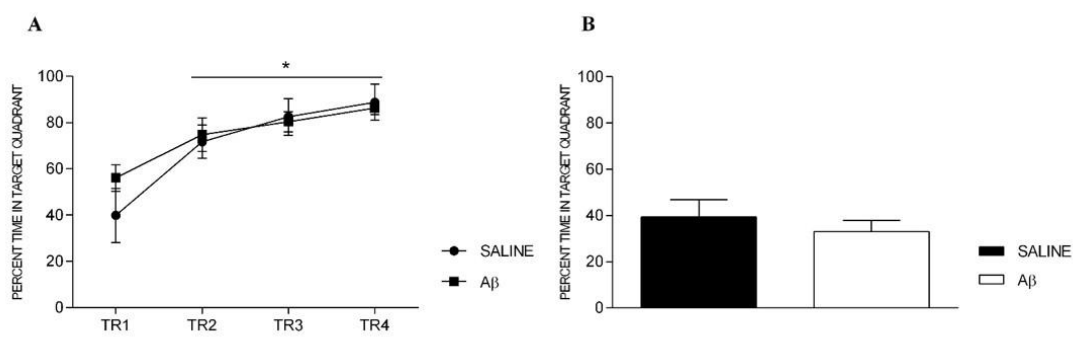


Figure 5

